UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Vyšetření tělních tekutin na automatickém analyzátoru XT – 4000i

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové, 2014 Blanka Tycová

„Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, dne 22. 4. 2014 .....

Mé upřímné poděkování patří především mému školiteli, panu doc. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D., za vstřícnou a odbornou pomoc během vypracování rigorózní práce.

Vděčné poděkování patří také paní primářce MUDr. Olze Erbenové za umožnění vypracování experimentální části na oddělení klinické hematologie v Pardubické krajské nemocnici, a.s. a také za možnost odborné konzultace.

Ráda bych také poděkovala paní Ing. Jindře Součkové a paní Miloslavě Taranzové za pomoc s analytickou problematikou při zpracování experimentální části. Poděkování patří i celému kolektivu oddělení klinické hematologie a především rodině, která mi byla po celou dobu oporou.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Kandidát: Blanka Tycová
Školitel: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.
Název rigorózní práce: Vyšetření tělních tekutin na automatickém analyzátoru XT - 4000i

Tato rigorózní práce je zaměřena na cytologické vyšetření tělních tekutin, které jsou analyzovány v hematologické laboratoři OKH v Pardubické krajské nemocnici, a.s. Jedná se o mozkomíšní mok, pleurální, perikardiální a abdominální tekutinu, peritoneální dialyzát a synoviální tekutinu.

Z naměřených dat během analýzy tělních tekutin bylo cílem zaměřit se na kontrolu kvality a zjistit preciznost, pravdivost, linearitu měření, a jaká je stabilita peritoneálního dialyzátu při laboratorní (21,7 °C) a chladničkové teplotě (6,9 °C).

Statistickým hodnocením naměřených dat bylo prokázáno, že analyzátor poskytuje validní hodnoty. Grafickým zpracováním bylo prokázáno, že měření opravdu probíhalo lineárně. Zároveň bylo prokázáno, že větší stabilitu vykazuje vzorek peritoneálního dialyzátu, který byl skladován při chladničkové teplotě (6,9 °C).

Korelace výsledků analýzy tělních tekutin zjištěných automatickým analyzátorem XT – 4000i a mikroskopickou metodou za použití Fuchs-Rosenthalovy počítací komůrky byla posledním cílem této práce. Statistickým hodnocením výsledků bylo prokázáno, že spolu nejlépe korelují výsledky vyšetření CSF. Zároveň je patrné, že je korelace slabá ve vysoce buněčných vzorcích serózních výpotků (RBC-BF a MN). Vzorky peritoneálních dialyzátů byly v daném období vyšetřovány nejméně. Statistické hodnocení tudíž není objektivní a je zapotřebí početnější soubor vyšetření.

Vyšetření tělních tekutin pomocí automatického analyzátoru XT – 4000i se řadí k novým metodám analýzy tělních tekutin. Proto je třeba zabývat se touto problematikou i nadále, sledovat nové trendy a pokusit se sjednotit informace, které by umožnily větší přehlednost v cytologickém vyšetření tělních tekutin.

ABSRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Analytical chemistry

Candidate: Blanka Tycová
Supervisor: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.
Title of rigorous thesis: Analysis of body fluids on the automatic analyzer XT – 4000i

This rigorous thesis focuses on the cytologic analysis of body fluids, which are analyzed in hematology laboratory OKH in the Pardubice regional hospital, a.s. These are the cerebrospinal fluid, pleural, pericardial and abdominal fluid, peritoneal dialysate and synovial fluid.

From the measured data during the analysis of body fluids has been to focus on quality control and determine precision, truthfulness, linearity measurements, and the stability of peritoneal dialysate in the laboratory (21.7 °C) and cooler temperatures (6.9 °C).

Statistical evaluation of the measured data showed that the analyzer provides the valid values. Graphic processing has been shown, that the measurement actually conducted linearly. The experiment confirmed, that greater stability shows a sample of peritoneal dialysate, that has been kept at a cooler temperature (6.9 °C).

In this rigorous thesis were performed correlation analysis results of analysis the body fluids in the automatic analyzer XT – 4000i and microscopic method, which used a Fuchs – Rosenthal counting chamber. Statistical evaluation of the results has shown that the best correlation have results of CSF. It is also apparent that the correlation is weak in high cell samples of serous effusion (RBC-BF and MN). Samples of peritoneal dialysate in a given period of at least analyzed. Statistic evaluation was not objective and need a larger set of examinations.

Examination of body fluids using an automatic analyzer XT - 4000i is one of the new methods for the analysis of body fluids. Therefore, it is necessary to deal with this issue continue to monitor new trends and try to unify information that would facilitate greater transparency in the cytological examination of body fluids.

SEZNAM ZKRATEK

BF	body fluid, tělní tekutina
CSF	cerebrospinal fluid, likvor
CT	počítačová tomografie
HA	hyaluronová kyselina
HF-BF	high fluorescence body fluid cells, buňky s vysokou fluorescencí
K_3EDTA	tridraselná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové
MN	počet mononukleárů
OKH	Oddělení klinické hematologie
PMN	počet polymorfonukleárů
RBC-BF	počet erytrocytů v tělních tekutinách
US	ultrasonografické vyšetření
WBC-BF	počet leukocytů v tělních tekutinách

OBSAH

1. ÚVOD ... 9

2. CÍL PRÁCE ... 10

3. TEORETICKÁ ČÁST ... 11

3.1. **Automatický analyzátor XT - 4000i** ... 12

3.1.1. Princip vyšetření BF ... 14

3.1.2. Výsledek vyšetření BF ... 16

3.2. **Mozkomíšní mok (CSF)** ... 17

3.2.1. Tvorba CSF ... 17

3.2.2. Poruchy cirkulace CSF ... 17

3.2.3. Lumbální punkce ... 18

3.2.4. Subokcipitální punkce ... 20

3.2.5. Laterocervikální punkce ... 20

3.2.6. Ventrikulární punkce ... 20

3.3. **Pleurální tekutina** ... 21

3.3.1. Tvorba pleurální tekutiny ... 21

3.3.2. Vznik pleurálního výpotku ... 21

3.3.3. Thorakocentéza ... 22

3.4. **Perikardiální tekutina** ... 24

3.4.1. Tvorba perikardiální tekutiny ... 24

3.4.2. Vznik perikardiálního výpotku ... 24

3.4.3. Perkutánní perikardiocentéza ... 25

3.5. **Abdominální tekutina** ... 27

3.5.1. Tvorba peritoneální tekutiny ... 27

3.5.2. Vznik ascitu ... 27

3.5.3. Abdominální paracentéza ... 28

3.6. **Peritoneální dialyzát** ... 30

3.6.1. Peritoneální dialyzační roztok ... 30

3.6.2. Peritoneální dialýza ... 30

3.7. **Synoviální tekutina** ... 32

3.7.1. Vznik synoviální tekutiny ... 32

3.7.2. Tvorba kloubního výpotku ... 33

3.7.3. Arthrocentéza ... 33

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 36
4.1. Kontrola kvality 36
4.2. Linearita měření 36
4.3. Stabilita BF 37
4.4. Korelace výsledků analýzy BF 38
4.4.1. Vyšetření BF na automatickém analyzátoru XT - 4000i 38
4.4.2. Mikroskopické vyšetření BF ve Fuchs-Rosenthalově počítací komůrce 40
5. VÝSLEDKY 41
5.1. Kontrola kvality 41
5.2. Linearita měření 42
5.3. Stabilita BF 43
5.4. Korelace výsledků analýzy BF 44
6. DISKUSE 56
6.1. Kontrola kvality 56
6.2. Linearita měření 56
6.3. Stabilita BF 56
6.4. Korelace výsledků analýzy BF 57
7. ZÁVĚR 58
8. LITERATURA 60

1. ÚVOD

Tělní tekutiny patří z biochemického hlediska mezi transcelulární tekutiny. Je pro ně typické, že za fyziologických okolností vyplňují různé tělesné dutiny ve velmi malém množství, ale za patologických stavů se jejich objem zvětšuje a mohou dále komplikovat patologický proces.

Mezi nejčastěji vyšetřované tělní tekutiny patří mozkomíšní mok, pleurální, perikardiální a abdominální tekutina, peritoneální dialyzát a synoviální tekutina.

Mozkomíšní mok vzniká ultrafiltrací krevní plazmy a aktivní sekrecí chorioideálních buněk, v malé míře i extrachorioideálních buněk.

Pleurální, perikardiální a abdominální tekutina je tvořena mezotelem serózní membrány, která je vývojově původem coelomové dutiny. Pro tyto tekutiny je charakteristické, že vznikají ultrafiltrací krevní plazmy. Pokud dojde k patologickému procesu, zvýší se jejich množství a mluvíme o výpotku, který lze podle povahy rozdělit na transudát a exsudát.

Peritoneální dialyzát je ultrafiltrátem krevní plazmy, který vzniká díky semipermeabilitě peritonea na principu ultrafiltrace a difúze. Jedná se o léčebnou metodu, která slouží k čištění krve pacientů s terminálním selháním ledvin a představuje tak jednu z alternativ léčby jako je například hemodialýza nebo transplantace ledviny.

Synoviální tekutina vzniká také ultrafiltrací krevní plazmy. Synovialocyty typu B je ještě doplněna o kyselinu hyaluronovou, která je zodpovědná za její viskozitu. Při patologických stavech dochází ke snížení viskozity synoviální tekutiny, což může vést k poškození kloubních chrupavek.

Odebraný vzorek tělní tekutiny je odesílán na mikrobiologické, biochemické a cytologické vyšetření. Velký přínos vyšetření tělních tekutin spočívá zejména v tom, že lékař může posoudit, jaký proces zrovna v dané tělesné dutině probíhá. Je jedním z vyšetření, které pomáhá odlišit, zda se jedná o infekci, zánět, krvácení či nádorové onemocnění. V některých případech na rychlosti a přesnosti interpretace nálezu často závisí i život nemocného.

Tato práce je zaměřena na cytologické vyšetření tělních tekutin, které spočívá v kvalitativním a kvantitativním vyšetření krevních buněk.

2. CÍL PRÁCE

Tato rigorózní práce má za cíl prostudovat informace o tělních tekutinách, které se vyšetřují v hematologické laboratoři OKH v Pardubické krajské nemocnici, a.s. Tyto poznatky pak zaměřit na analytickou problematiku cytologického vyšetření tělních tekutin.

Z naměřených dat během analýzy tělních tekutin se zaměřit na kontrolu kvality a zjistit jaká je preciznost, pravdivost a linearita měření. Dále pak zhodnotit jaká je stabilita peritoneálního dialyzátu při laboratorní (21,7 °C) a chladničkové teplotě (6,9 °C).

V experimentální části také zjistit korelaci výsledků analýzy tělních tekutin zjištěných automatickým analyzátorem XT – 4000i a mikroskopickou metodou za použití Fuchs - Rosenthalovy počítací komůrky.

3. TEORETICKÁ ČÁST

Pod pojem tělní tekutiny (body fluids, BF) lze zařadit tekutiny, které z biochemického hlediska patří do tzv. transcelulárních tekutin. Tělní tekutiny vyplňují různé tělesné dutiny – fyziologicky ve velmi malém množství. Při patologických stavech se však jejich objem zvětšuje a mohou dále komplikovat patologický proces [1].

V hematologické laboratoři OKH v Pardubické krajské nemocnici, a.s. se vyšetřují tyto tělní tekutiny: mozkomíšní mok, pleurální, perikardiální a abdominální tekutina, peritoneální dialyzát a synoviální tekutina [2].

Vyšetření mozkomíšního moku odstartovala první lumbální punkce v roce 1891. Nyní patří vyšetření této BF mezi rutinní metody při podezření na onemocnění centrálního nervového systému po celém světě [3].

Pleurální, perikardiální a abdominální tekutina představují tělní tekutiny, které se vyskytují v serózních dutinách. Pro tyto serózní dutiny je charakteristické, že jsou vývojově derivátem výstelky původně jednotné coelomové dutiny. Vznikem bránice, vývojem srdce a plic se coelomová dutina postupně rozdělí na peritoneální, perikardiální a dvě pleurální dutiny [4].

Každá z těchto serózních dutin je lemována tenkou vrstvou plochých mezoteliálních buněk spočívajících na *lamina basalis*. Část serózy tvořící vnější stěnu dutiny se nazývá parietální list serózy, část pokrývající vnitřní orgány se nazývá viscerální list serózy. Tenký prostor mezi parietálním a viscerálním listem je fyziologicky vyplněn malým množstvím BF. Produkce a resorpce serózních tekutin je fyziologicky v rovnováze. Pokud dojde k narušení rovnováhy, BF se zde začne hromadit a hovoříme o výpotku. Serózní výpotky lze podle svého složení rozdělit na transsudáty a exsudáty [4, 5].

Existence synoviální tekutiny v kloubech je známá již od Hippokrata. Avšak první arthrocentéza byla v literatuře popsána až v 16. století [6].

Tělní tekutiny jsou po odběru urychleně odeslány na cytologické, mikrobiologické a biochemické vyšetření. Z laboratorních výsledků pak lze v korelaci s klinickým nálezem zahájit včasnou a účinnou léčbu [7].

3.1. Automatický analyzátor XT - 4000i

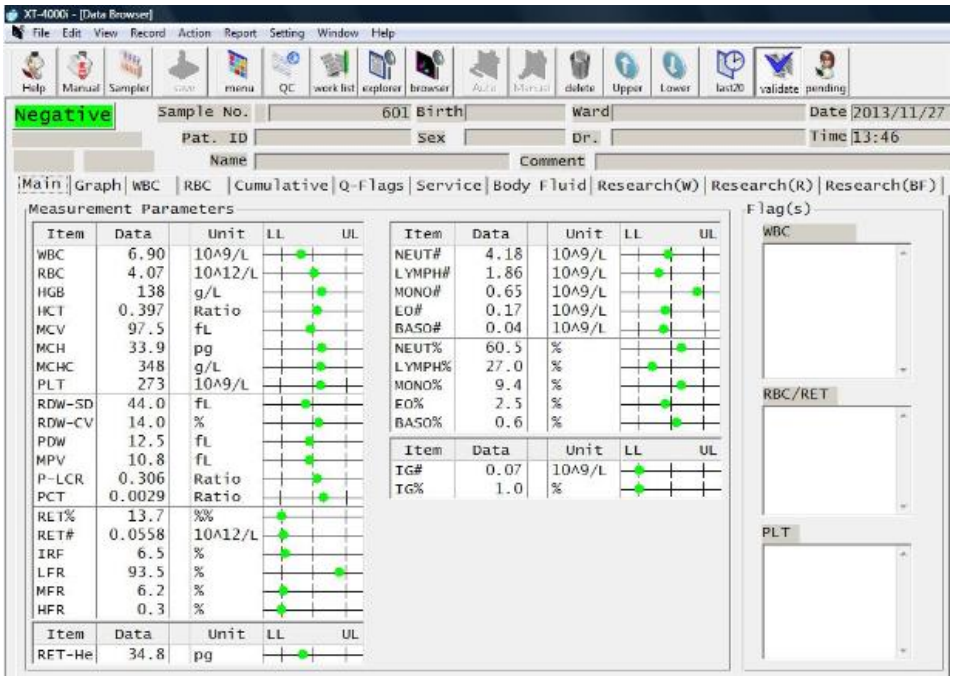
Tělní tekutiny mohou být analyzovány mikroskopicky. Jedná se o tradiční metodu, avšak časově náročnou, pracnou a subjektivní. Automatizace analýzy tělních tekutin tyto nedostatky eliminuje [8].

V hematologické laboratoři OKH Pardubické krajské nemocnice, a.s. k těmto účelům slouží automatický hematologický analyzátor XT - 4000i - viz Obr. 1, jehož výrobcem je společnost Sysmex Corporation (Kobe, Japonsko) [2, 9].

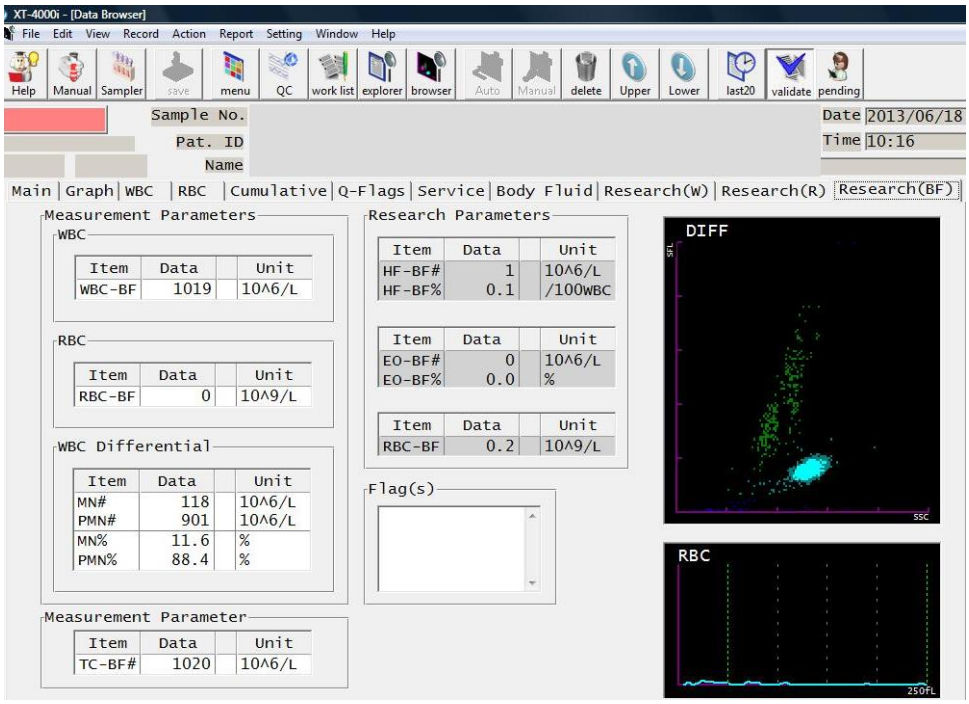
Obr. 1: Automatický hematologický analyzátor XT – 4000i [10]

Ze vzorku periferní krve odebrané do K_3EDTA lze na tomto analyzátoru vyšetřit krevní obraz, diferenciální rozpočet leukocytů nebo počet retikulocytů – viz Obr. 2 a to v otevřeném (manuálním), uzavřeném nebo kapilárním systému [9].

Pro analýzu BF slouží speciální mód „Body Fluid“, ve kterém lze vzorky BF analyzovat pouze v otevřeném systému. Výsledek analýzy znázorňuje Obr. 3 [9].



Obr. 2: Výsledek vyšetření periferní krve [11]



Obr. 3: Výsledek vyšetření BF [12]

Postup analýzy BF je stejný jako při analýze krevních vzorků v otevřeném systému, ale je nezbytné, aby byly spolehlivě odstraněny vlivy pozadí. Proto před každou analýzou BF analyzátor nejprve provede kontrolu pozadí, tzv. background. Pokud je hodnota pozadí WBC-BF $\leq$ 0,001 x 10^3/l a RBC-BF $\leq$ 0,003 x 10^6/l, je kontrola pozadí skončena a analyzátor je připraven k analýze BF [9].

Bezprostředně před analýzou BF je třeba šetrné, ale dostatečné promíchání vzorku. Aspirovaný objem BF na 1 analýzu představuje přibližně **85 µl**. **Za 1 hodinu je možno analyzovat až 30 vzorků BF [**9].

3.1.1. Princip vyšetření BF

Analýza BF probíhá na dvou základních principech. Jedná se o **impedanční princip a fluorescenční průtokovou cytometrii [**13].

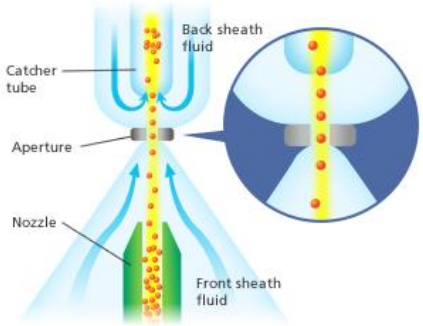
A. Impedanční princip

Impedanční princip s využitím hydrodynamické fokusace slouží ke stanovení počtu erytrocytů (RBC-BF). V literatuře je tento způsob analýzy označován také jako DC detection method [9].

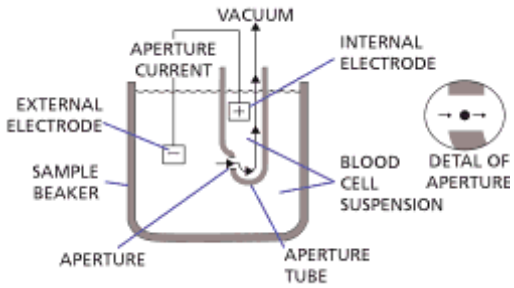
Vzorek určený k analýze RBC-BF je nejprve zředěn na specifický poměr a poté vstřikován tryskou (nozzle) do měřicí apertury (aperture). Jakmile takto zředěný vzorek opustí trysku, je obklopen diluentem (front sheath solution), který zajistí, že bude vstupovat do měřící apertury buňka po buňce a to středem otvoru apertury. Schéma hydrodynamické fokusace je znázorněné na Obr. 4. Díky hydrodynamické fokusaci je eliminována koincidence. [14, 15].

Vstupem RBC-BF do měřící apertury, kterou prochází stejnosměrný proud mezi elektrodami (viz Obr. 5), dojde ke změně odporu, který je úměrný objemu RBC-BF a je detekován jako impulz. Výška každého impulzu informuje o objemu RBC-BF a celkový počet impulzů poskytuje informaci o celkovém počtu RBC-BF. Impulzy jsou následně zpracovány graficky [15, 16].

Při výstupu z měřící apertury je RBC-BF obklopen diluentem (back sheath solution) a odveden do zachycovací hadičky (catcher tube), čímž je zajištěno, že není detekován abnormální impulz [16].



Obr. 4: Schéma hydrodynamické fokusace [17]



Obr. 5: Impedanční princip [18]

B. Fluorescenční průtoková cytometrie

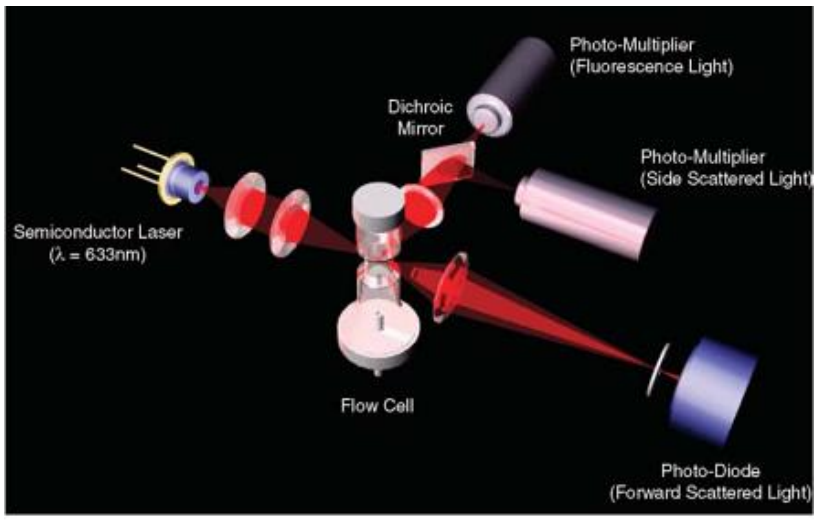
Stanovení počtu a diferenciálního rozpočtu leukocytů je založeno na principu **fluorescenční průtokové cytometrie s použitím polovodičového laseru** [14].

Vzorek je aspirován a ředěn na specifický poměr v měřícím kanále DIFF. Stromatolyser-4DL způsobí hemolýzu erytrocytů. Ve stejný okamžik také dojde k perforaci membrány leukocytů, čímž je umožněn vstup fluorescenčního barviva (Stromatolyser-4DS), které je afinitní k DNA/RNA, do leukocytu [14].

Takto připravené leukocyty jsou pomocí hydrodynamické fokusace přivedeny do průtokové cely - buňka po buňce. Z polovodičového laseru je na leukocyt vyzařován laserový paprsek o vlnové délce 633 nm (viz Obr. 6), který je po dopadu na buňku detekován [19, 20, 21].

- **Forward scattered light** (**FSC**) – intenzita přímého rozptylu laserového paprsku informuje o velikosti buňky [20].
- **Side scattered light (SSC)** - intenzita bočního rozptylu laserového paprsku informuje o vnitřních buněčných strukturách [20].
- **Side fluorescence light (SFL)** - intenzita vyzářeného fluorescenčního světla odpovídá obsahu DNA/RNA v buňce [20].

Pomocí fotonásobiče a fotodiod je světlo převedeno na elektrické impulzy, které jsou zpracovány a vyhodnoceny počítačem [9].



Obr. 6: Fluorescenční průtoková cytometrie s použitím polovodičového laseru [22]

3.1.2. Výsledek vyšetření BF

Výsledek vyšetření BF z analyzátoru XT-4000i, který je znázorněn na Obr. 3, je možno rozdělit z analytického hlediska na dvě hlavní části. Výsledek je ještě doplněn o DIFF scattergram a RBC histogram [9].

Measurements parameters v levé části výsledku poskytují informace o naměřených hodnotách, které se přenášejí do laboratorního informačního systému [9].

Jedná se o:

- počet leukocytů: **WBC-BF**
- počet erytrocytů: **RBC-BF**
- absolutní počet mononukleárů: **MN#**
- absolutní počet polymorfonukleárů: **PMN#**
- relativní počet mononukleárů: **MN%**
- relativní počet polymorfonukleárů: **PMN%**

Research Parameters jsou výzkumné parametry, které se do laboratorního informačního systému nepřenášejí, ale poskytují doplňující informace o BF [9].

Kromě výzkumného počtu RBC-BF a relativního a absolutního **počtu eozinofilů (EO-BF)** sem patří i relativní a absolutní počet tzv. **HF-BF buněk**. Jedná se o buňky s vysokou fluorescencí (odkud pochází i jejich zkratka: high fluorescence body fluid cells), které mají vyšší obsah DNA/RNA než ostatní populace WBC-BF. Může se jednat o nádorové buňky, histiocyty nebo mezotelie. Při nálezu vyššího počtu HF-BF buněk je třeba provést morfologické hodnocení přítomných krevních buněk mikroskopicky [9, 14, 23].

3.2. Mozkomíšní mok (CSF)

Mozkomíšní mok je v literatuře označován také jako likvor (*liquor cerebrospinalis*), nebo cerebrospinální tekutina. Z anglického názvu cerebrospinal fluid vychází používaná mezinárodní zkratka CSF [24].

Jedná se o životně důležitou tělní tekutinu, která má komplexní funkci. Obklopuje mozek a míchu ze všech stran a chrání je před nárazy a otřesy. Ochrannou a regulační funkci plní CSF také při změnách teploty a atmosférického tlaku. Účastní se na metabolismu neuronů, odstraňování produktů katabolismu a na imunologických procesech [24].

3.2.1. Tvorba CSF

Více než polovina CSF (55 – 70 %) je tvořena aktivní sekrecí chorioideální i extrachorioideální. Zbylá část vzniká ultrafiltrací plazmy. Celkové množství CSF je u kojenců 40 - 60 ml, u dospělého člověka za fyziologických podmínek 120 - 180 ml v závislosti na velikosti komor. Denní produkce CSF, která je nezávislá na stáří jedince, představuje 430 – 580 ml [24].

V průběhu života se množství CSF zvětšuje na úkor mozkového parenchymu. U dětí a mladých dospělých činí objem nitrolebečního CSF asi 6 – 7 % celkového nitrolebečního objemu, po 60. roce je to již asi 9 % a po 80. roce více než 14 % [25].

Rychlost tvorby CSF je v základě nezávislá na nitrokomorovém tlaku. Na rozdíl od produkce je rychlost resorpce na hodnotách tlaku CSF zcela závislá. Mezi tvorbou a resorpcí CSF je za normálních okolností rovnováha [25].

3.2.2. Poruchy cirkulace CSF

Klíčovým faktorem pro fyziologický průtok CSF je volná průchodnost komorového systému a subarachnoideálních prostor. Při poruše cirkulace CSF dochází k jeho zmnožení, zvyšuje se likvorový tlak, dochází k rozšíření komorového systému a vzniká hydrocefalus. Od hydrocefalu je vždy nutno odlišit mozkovou atrofii [25, 26].

3.2.3. Lumbální punkce

Mozkomíšní mok je získáván nejčastěji lumbální punkcí, méně často subokcipitální nebo laterocervikální punkcí. V neurochirurgickém prostředí lze mozkomíšní mok získat také punkcí postranní komory mozkové – tzv. ventrikulární punkcí [24].

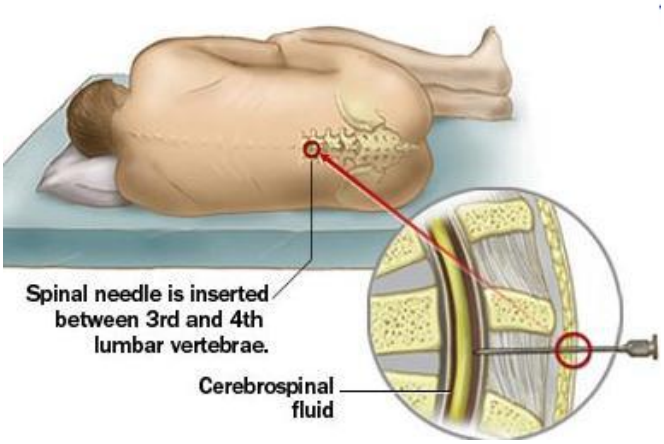
Lumbální punkce může být indikována jak u akutních stavů, tak u onemocnění s chronickým průběhem. Základní význam má její provádění při podezření na **neuroinfekci**, **subarachnoideální krvácení**, **neurologická a nádorová onemocnění**. Lumbální punkce je také součástí anesteziologických postupů **– spinální anestezie**. Rovněž se využívá při podávání **intratékální chemoterapie** [25].

Absolutní kontraindikací lumbální punkce je **nitrolební hypertenze** s projevy městnání na očním pozadí. Provedení lumbální punkce by vedlo ke vzniku mozkové herniace a následné smrti [25].

Při lumbální punkci je nemocný **v poloze vsedě** nebo v **poloze na boku** s maximální flexí celé páteře, jak znázorňuje Obr. 7 [25].

Správnost etáže je kontrolována palpací horních okrajů hřebenů kyčelních kostí, kdy se na jejich spojnici u většiny lidí promítá meziobratlový prostor L_4 - L_5. Lumbální punkce se nejčastěji provádí u dospělých v prostoru $\mathbf{L_3 – L_4}$, vhodné je také použít L_4 - L_5 nebo L_5 – S_1. U dětí je vhodné zvolit přístup mezi trny L_4 – L_5 nebo L_5 - S_1 [25].

Místo pro punkci lékař označí na kůži fixem a provede dezinfekci kůže v rozsahu celé bederní páteře. Lumbální punkci je nutné provádět za přísně sterilních podmínek. K odběru CSF se používá **atraumatická jehla s mandrénem** [25].



Obr. 7: Provedení lumbální punkce [27]

Průnik hrotu jehly skrz ligamentum flavum a dura mater se může projevit změnou odporu tkáně, pak by mělo dojít k vytažení mandrénu. Neodkapává-li CSF, napomůže rotace jehly. Při odběru se posuzuje **vzhled CSF** – viz Tab. 1, jeho tlak a provádějí se manévry na zjištění průchodnosti likvorových cest [1].

Tab. 1: Vzhled CSF [1]

Příčina změny CSF	Zbarvení a zákal CSF
Fyziologicky	Čirý a bezbarvý
Zánět	Zakalený, žlutý až žlutozelený; Intenzita zákalu je přímo úměrná počtu leukocytů.
Krvácení	Narůžovělý až červený
Bilirubin	Kanárkově žluté zbarvení
Obstrukce	Žlutý
Methemoglobin	Okrově žlutý až hnědý CSF

Před vytažením jehly je vsunut mandrén. Místo vpichu je několik minut komprimováno přes sterilní gázu a pak sterilně kryto [25].

Doba, po kterou má být pacient po provedené lumbální punkci na lůžku, se u různých autorů liší. Při použití standardních jehel je doporučováno, aby pacient zůstal 1 - 2 hodiny ležet na břiše a potom ještě 24 hodin ve vodorovné poloze. Při použití atraumatické jehly lze lumbální punkci provést ambulantně. Pacient po výkonu leží ve vodorovné poloze na břiše po dobu 1 hodiny [24].

CSF je odebírán frakcionovaně minimálně do tří sterilních zkumavek bez protisrážlivého roztoku. K vyšetření se odebírá **10 – 15 ml CSF** a je transportován na biochemické, mikrobiologické a cytologické vyšetření. Na cytologické vyšetření je třeba 1 ml CSF [24, 28].

Buněčné elementy v krátké době po odběru podléhají morfologickým a poté destruktivním změnám. Proto je pro cytologické vyšetření třeba odebraný vzorek CSF transportovat do laboratoře nejpozději **do 30 minut** od odběru a provést cytologické vyšetření nejpozději **do 1h od odběru** [24, 25].

V případě, že vzorek nelze v uvedenou dobu vyšetřit, měl by být uchován v chladničce při 4 °C. Pokud je předpokládané zpoždění vyšetření delší než 48 hodin, doporučuje se vzorek konzervovat přidáním 50 % etanolu v poměru 1:1 [28].

Popis cytologických nálezů v CSF není jednotný. Níže uvedené údaje v Tab. 2 vycházejí z klasifikace předložené MUDr. Pavlem Adamem [25].

Fyziologicky v CSF převažují mononukleáry. Lymfocyty tvoří 50 – 80 %, 20 - 50 % monocyty. V obou řadách převažují klidové formy. Polymorfonukleáry se za normálních okolností v CSF nevyskytují. Obvyklý je však jejich nález při arteficiální příměsi krve v CSF [24, 25].

Tab. 2: Počet elementů v CSF [24]

CSF	Počet elementů [10^6/l]
Fyziologicky (dospělí)	0 – 10/3
Fyziologicky (novorozenci)	45/3
Hraniční hodnota	11/3 – 15/3
Patologicky	> 15/3

3.2.4. Subokcipitální punkce

Při subokcipitální punkci se CSF získává nabodnutím cisterna cerebellomedullaris přes atlantookcipitální membránu. Od této punkce se však upouští kvůli riziku nabodnutí vertebrální tepny při jejím abnormálním průběhu [24].

3.2.5. Laterocervikální punkce

Laterocervikální punkce je prováděna v poloze vleže na břiše za skiaskopické kontroly, kdy se z laterální strany zavádí punkční jehla mezi oblouky obratlů C_1 a C_2 do zadního subarachnoideálního prostoru krční míchy. Laterocervikální punkce se používá především v neuroradiologii ke krční perimyelografii. [24].

3.2.6. Ventrikulární punkce

Ventrikulární punkci provádí neurochirurg na operačním sále. Po punkci pacient obvykle leží ještě 24 hodin a nesmí zvedat hlavu výš než o 15 - 20 ° [29].

Ventrikulární punkce je prováděna vzácně v případech, kdy by lumbální punkce mohla způsobit herniaci mozku a další komplikace [29].

3.3. Pleurální tekutina

Pleura je tenká serózní blána, tvořená jemnou elastickou vrstvou vaziva, které je pokryté vrstvou plochých mezotelových buněk. Prostor mezi viscerální (poplicnice) a parietální (pohrudnice) pleurou vytváří pleurální dutinu, která je fyziologicky široká 10 - 20 μm a je vyplněna malým množstvím pleurální tekutiny (0,26 ± 0,10 ml/kg tělesné hmotnosti) s obsahem bílkovin menším než 15 g/l. Pleurální tekutina umožňuje pohyb parietální a viscerální pleury po sobě a udržuje negativní intrapleurální tlak [4, 30].

3.3.1. Tvorba pleurální tekutiny

Pleurální tekutina vzniká jako ultrafiltrát krevní plazmy. Sekrece přibližně 50 ml/24 h se děje z kapilár apikálních partií parietální pleury a resorpce pak mízními cévami v diafragmatické a mediastinální oblasti viscerální pleury. Kapacita této lymfatické drenáže je značná – ještě při asi 10 násobném zvýšení filtrovaného množství se objem pleurální tekutiny udržuje v normě [30, 31].

3.3.2. Vznik pleurálního výpotku

Teprve tehdy, přesáhne-li tvorba maximální možnosti lymfatické drenáže (přibližně 700 ml/24 h), vzniká **pleurální výpotek (fluidotorax)**. Podle složení akumulované pleurální tekutiny můžeme rozlišit tzv. transsudát a exsudát [30, 31].

Při **transsudátech** jsou porušeny systémové faktory, je zvýšený hydrostatický tlak (srdeční selhání), snížený onkotický tlak (hypoalbuminémie), vyšší negativní intrapleurální tlak (atelektáza), transdiafragmatický přesun tekutiny (ascites) nebo patologická komunikace (urinotorax). Transsudáty bývají často oboustranné a jejich vzhled i složení se velmi podobá plazmě [32].

Exsudáty vznikají při poruše pleury samotné. Přispívá k tomu zvýšená permeabilita cév (pneumonie), porušená kontinuita cév (chylotorax), snížená lymfatická drenáž (nádor) nebo patologická komunikace (pseudocysta pankreatu) [32].

Důsledkem fluidotoraxu je kompresní atelektáza přilehlé plíce, která může být při delším trvání výpotku fixována v této poloze viscerální pachypleurou a může zůstat po evakuaci výpotku neexpandibilní. Možným důsledkem je restrikční ventilační

porucha a respirační insuficience. Velké výpotky mohou vést k přetlačení mediastina na zdravou stranu s oběhovými důsledky [30].

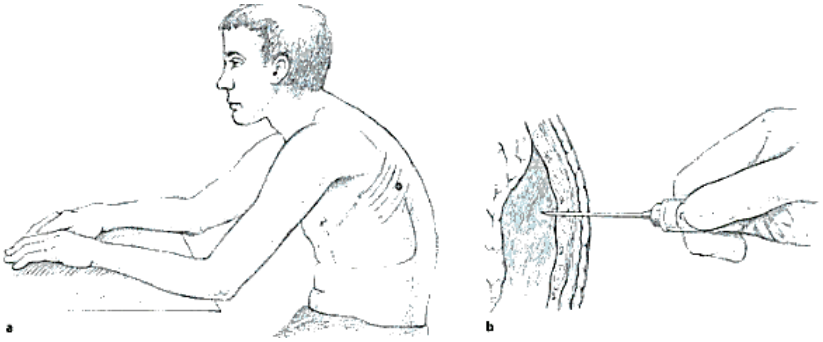
Mezi **příznaky tvorby** výpotku patří dušnost, tupá bolest, pro kterou je charakteristické, že je vázána na dýchací pohyby a je nejčastěji pociťována pod lopatkou (ale může progredovat i do břišní dutiny nebo do ramene na téže straně). Mezi nespecifické příznaky pleurálního výpotku patří suchý kašel a teplota [4].

Při fyzikálním vyšetření hrudníku lze prokázat množství pleurálního výpotku větší než 500 ml, menší množství lze prokázat zobrazovacími technikami [24].

3.3.3. Thorakocentéza

Pleurální výpotek je získáván hrudní punkcí (thorakocentézou). Punkce je prováděna po lokalizaci výpotku u sedícího pacienta (Obr. 8) obvykle v zadní axilární čáře dvě mezižebří pod horním okrajem výpotku, event. v místě označeném pod ultrasonografickou kontrolou (US). Punkční jehla je zaváděna při horním okraji dolního žebra (po lokálním znecitlivění), čímž je zajištěno nižší riziko poranění nervově cévního svazku [31].

Transsudáty bývají čiré a nažloutlé. Exsudáty mívají barvu jantarovou nebo sanguinolentní, mohou být lehce zakalené. Hemotorax má vzhled hemoragický, chylotorax a pseudochylotorax jsou mléčně zakalené. Empyém je kalný, nazelenalý, hnědavý nebo šedý [31].



Obr. 8: Provedení thorakocentézy [33]

Pro laboratorní účely se odebírá 25 – 30 ml pleurálního výpotku, přičemž na cytologické vyšetření je odebráno 5 – 7 ml do zkumavky s protisrážlivým roztokem K_3EDTA [5, 31].

Fyziologicky je pleurální tekutina čirá a bezbarvá obsahující **1700 x 10 ^{6}/l leukocytů**. Zastoupeny jsou především makrofágy - 75 % a lymfocyty – 23 % [31].

Pleurální výpotky lze z cytologického hlediska rozdělit podle převažujících buněk, přehled viz Tab. 3 [34].

Tab. 3: Rozdělení pleurálních výpotků z cytologického hlediska [31]

Pleurální výpotek	Výskyt
Lymfocytární	TBC pleuritida (mezotelie < 0,5 %), nádory, virové infekce
Lymfo - mezoteliální	nádory
Mezoteliální	nádory, plicní embolie
Neutrofilní	pneumonie, plicní embolie, traumata, perforace jícnu
Eozinofilní	alergie, plicní embolie, trauma, azbest
Erytrocytární	nádory, trauma, plicní embolie
Maligní	nádory

3.4. Perikardiální tekutina

Perikard obklápí srdce formou vaku. Jedná se o strukturu, která umožňuje hladký pohyb srdce ve vztahu k ostatním orgánům mediastina, a také umožňuje anatomickou fixaci srdce a velkých cév. Nezanedbatelná není ani schopnost perikardu bránit náhlému zvýšení srdečního objemu [35].

Přestože má perikard mnoho důležitých funkcí, není pro život nezbytný a jeho vrozená nepřítomnost nebo chirurgické odstranění nemají nepříznivé důsledky [35].

Bylo prokázáno, že se perikard skládá ze serózní a fibrózní vrstvy. **Fibrózní perikard** obsahuje množství kolagenních a elastických vláken. Svou bazí je přirostlý na centrum tendineum bránice. Přední částí je fibrózní perikard spojen se sternem a po stranách je obklopen pleurálními dutinami [36, 37].

Serózní perikard představuje samostatný vak, který obaluje srdce. Vnitřní povrch serózního perikardu je těsně spojen s povrchem srdce a nazývá se **viscerální perikard,** nebo také **epikard**. Vnější povrch serózního perikardu se nazývá **parietální perikard** a je spojen s tenkou vrstvou fibrózního perikardu [38].

3.4.1. Tvorba perikardiální tekutiny

Mezi oběma serózními listy perikardu se nachází **perikardiální dutina**, která obsahuje fyziologicky **15 – 50 ml serózní tekutiny**, která vzniká jako ultrafiltrát krevní plazmy a je důležitá pro hladký pohyb obou listů po sobě při pohybech srdce [35].

Perikardiální tekutina je kontinuálně tvořena buňkami mezotelu a resorbována cestou lymfatických a krevních cév [39].

3.4.2. Vznik perikardiálního výpotku

Pokud dojde k nerovnováze mezi tvorbou a vstřebáváním perikardiální tekutiny, vzniká perikardiální výpotek, který může být dle mechanismu svého vzniku řazen mezi transsudáty nebo exsudáty [40].

K transsudátu (hydroperikardu) dochází při zvýšené kapilární permeabilitě, nízkém onkotickém tlaku plazmy, retenci sodíku a vody při obstrukci drenáže tekutiny lymfatickými cévami. Exsudát je výsledkem zánětu, traumatu nebo malignity [41].

Příčiny vzniku perikardiálního výpotku jsou mnohočetné. Kromě všech typů akutní perikarditidy vznikající z infekční, imunologické nebo fyzikální příčiny dochází k výpotku u zhoubných nádorů, ledvinného selhání, myxedému, traumatu, ruptury srdce nebo aorty, v těhotenství, u chyloperikardu nebo u stavů s retencí soli a vody nejrůznější etiologie, včetně chronického srdečního selhání, nefrotického syndromu či jaterní cirhózy [41].

Objem výpotku, který podstatněji nezpůsobuje útlak srdce, závisí na rychlosti akumulace perikardiální tekutiny a také na biomechanických vlastnostech perikardu. Hromadí-li se výpotek pomalu, perikard se natahuje a může pojmout až 2 litry perikardiální tekutiny bez zvýšení intraperikardiálního tlaku. Při rychlé tvorbě výpotku dochází ke zvýšení intraperikardiálního tlaku, a tím k útlaku srdce, již při nahromadění 200 ml perikardiální tekutiny [41].

Nejdostupnějším vyšetřením pro potvrzení diagnózy perikardiálního výpotku, je **echokardiografické vyšetření**, které umožňuje diagnostikovat výpotky, jejichž objem je hraniční k fyziologickému množství tekutiny v perikardiální dutině. CT a nukleární magnetická rezonance jsou voleny v diagnosticky nejasných případech [41].

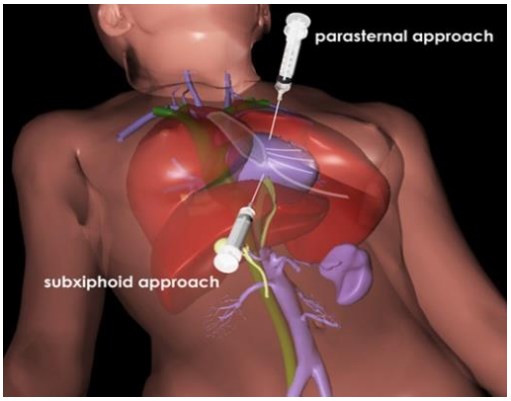
Za malý výpotek je pokládán výpotek se separací serózních listů perikardu < 10 mm, u středně velkého se pohybuje separace listů perikardu mezi 10 a 20 mm a u velkého výpotku nacházíme separaci > 20 mm [41].

3.4.3. Perkutánní perikardiocentéza

Odběr perikardiálního výpotku se nazývá **perkutánní perikardiocentéza**. Měla být prováděna v katetrizační laboratoři pod echokardiografickou či skiaskopickou kontrolou. Pacient je monitorován kontinuálně elektrokardiograficky a opakovaně je také měřen krevní tlak [41].

Punkce se provádí nejčastěji těsně pod **processus xiphoideus** (viz Obr. 9) u pacienta se zvýšenou polohou hrudníku (poloha vsedě nebo vpolosedě), při které se výpotek posunuje více k místu punkce. Tento přístup je extrapleurální bez nebezpečí poranění věnčitých tepen. Jehla po dosažení vnitřní strany processus xiphoideus směřuje dozadu a nahoru (úhel asi 15 °) ve směru k pravému nebo levému rameni. V menším procentu je punkce prováděna apikálním anebo parasternálním přístupem [41].

Místo perikardiocentézy, které bylo určeno echokardiografickým vyšetřením, se označí a dezinfikuje. Kůže a podkožní tkáně se znecitliví lokálním anestetikem a dále se postupuje podle zásad asepse. Po celou dobu průniku jehly se provádí aspirace pomocí připojené injekční stříkačky. Dříve používaná punkce kovovou jehlou se dnes již neprovádí. Po průniku jehly do perikardiální dutiny se vnitřkem jehly proto zavede ohebný vodící drát s měkkým koncem a po něm pak katetr s více otvory na konci, či kanyla, kterými se tekutina aspiruje, příp. jimi lze změřit intraperikardiální tlak [42].



Obr. 9: Provedení perkutánní perikardiocentézy [43]

Údaje o množství odebírané perikardiální tekutiny pro cytologické vyšetření se v literatuře liší. Baer a Smith uvádějí, že je perikardiální tekutina odebírána do zkumavky s protisrážlivým roztokem K_3EDTA v množství 5 - 7 ml [5].

Vzhled perikardiální tekutiny závisí na okolnostech jejího vzniku. Za normálních okolností se jedná o čirou, mírně nažloutlou tekutinu. Běžný hydroperikard je čirý, nažloutlý (barvy slámy), u zánětů a nádorů je zakalený, chyloperikard má mléčný vzhled a hemoperikard je krvavý [44].

Fyziologické hodnoty WBC-BF v perikardiální tekutině se v literatuře liší. Leeuwen, A. M. et al. uvádí, že je fyziologicky v perikardiální tekutině přítomno **< 300 x 10^6/l WBC-BF**. Zatímco Rush University Medical Center uvádí, že je WBC-BF fyziologicky **< 500 x 10^6/l**, < 25 % PMN a 0 RBC-BF [45, 46].

Literatura se shoduje v cytologickém hodnocení transsudátů a exsudátů. V transsudátech je přítomno < 1000 x 10^6/l a v exsudátech > 1000 x 10^6/l WBC-BF [44].

3.5. Abdominální tekutina

Peritoneum je největší serózní membránou v lidském těle. Jeho celková plocha činí kolem 2 m^2. Jedná se o semipermeabilní membránu, která vystýlá dutinu břišní a část dutiny pánevní [47].

Peritoneum, ohraničující peritoneální dutinu, není zcela těsně přiloženo na fascie břišní stěny. Mezi peritoneem a břišní stěnou tak popisujeme extraperitoneální prostor (*spatium extraperitoneale*), který se skládá z retroperitoneálního, preperitoneálného a subperitoneálního prostoru [47].

Nejhlubší (nejkaudálnější) místo peritoneální dutiny u muže představuje excavatio rectovesicalis. U ženy toto místo tvoří excavatio rectouterina (tzv. Douglasův prostor) a excavatio vesicouterina [47].

V peritoneální dutině, stejně jako v ostatních serózních dutinách, rozlišujeme parietální a viscerální list peritonea. Parietální list peritonea pokrývá stěny břišní dutiny. Viscerální list peritonea pokrývá orgány uložené uvnitř peritoneální dutiny. V místech, kde parietální peritoneum přechází do viscerálního peritonea, tvoří peritoneum dvojité listy – tzv. závěsy, mesenteria. Mesenteriem přicházejí k orgánu jeho cévy a nervy [47, 48].

3.5.1. Tvorba peritoneální tekutiny

Buňky mezotelu umožňují průchod (dialýzu) malého množství serózní tekutiny do peritoneální dutiny a také průchod makrofágů. Z peritoneální dutiny je pak peritoneální tekutina odváděna diafragmatickými lymfatickými cévami. Tyto děje jsou za fyziologických okolností v rovnováze [47, 49].

Peritoneální dutina obsahuje fyziologicky malé množství (přibližně do 50 ml) čiré, nažloutlé peritoneální tekutiny, která uvedené listy peritonea lubrikuje a umožňuje tak orgánům hladký pohyb navzájem, ale také pohyb podél břišní stěny [50].

3.5.2. Vznik ascitu

Při patologických stavech množství peritoneální tekutiny přesáhne kapacitu zpětné lymfatické drenáže, která se pohybuje mezi 1 – 5 litry za 24 hodin. Tato hromadící se tekutina je pak označována jako ascites. Podle povahy svého vzniku se dělí na transsudát nebo exsudát [51].

Ve většině případů je ascites důsledkem jaterního onemocnění – cirhózy (85 %). Maligní onemocnění je příčinou ascitu přibližně v 10 % případů, srdeční selhání v méně než 5 % případů. Dalšími příčinami ascitu mohou být Budd-Chiariho syndrom, myxedém, systémová onemocnění pojiva, tuberkulóza nebo ascites při nefrotickém syndromu [51].

K rozvoji ascitu dochází častěji zvolna, menší množství ascitu způsobí většinou jen nespecifické dyspeptické obtíže. Později se přidává tlak v břiše. Větší množství vede k dušnosti a později se objevují i obtíže pohybové [52].

Při fyzikálním vyšetření je břicho vyklenuté, vleže sahá nad úroveň hrudníku a při větším objemu se stěna břišní vyklenuje i laterálně [53].

Kromě vyšetření pohledem lze ascites vyšetřit i poklepem (pokud je objem ascitu větší než 1000 ml) u pacienta v poloze na zádech a pokud to jeho stav dovolí i ve stoje. U většího ascitu je přítomen **undulační fenomén** (hmatný náraz tekutiny vyvolaný úderem na protilehlou stěnu břišní) [54].

US vyšetřením břicha lze volnou tekutinu potvrdit i při malém zvýšení fyziologického množství peritoneální tekutiny. Definitivní diagnóza je pak stanovena po provedení abdominální paracentézy [51].

3.5.3. Abdominální paracentéza

Při abdominální paracentéze je pacient na lůžku v polosedě s opřenými zády a lehce pokrčenými dolními končetinami. Místo vpichu (Obr. 10) je v levém dolním břišním kvadrantu na třetině spojnice spina iliaca anterior superior a pupku. Punkci lze provést také v pravém dolním břišním kvadrantu, event. ve střední čáře mezi pupkem a sponou stydkou, avšak tato místa jsou volena méně často z důvodu zvýšeného rizika poranění orgánů. Paracentéza je prováděna za přísně sterilních podmínek po předchozí dezinfekci kůže a aplikaci lokálního anestetika [55].

Obr. 10: Místa pro provedení abdominální paracentézy [56]

Ascites je obvykle čirá tekutina nažloutlé barvy. Zkalený může být při infekci, krvavě zbarvený při hepatocelulárním karcinomu nebo jiném maligním onemocnění. Chylózní ascites je známkou vysoké koncentrace triacylglycerolů. Tmavě hnědý ascites svědčí pro vysokou koncentraci bilirubinu při perforaci žlučovodů [51].

Při cytologické analýze abdominální tekutiny je fyziologicky méně než **500 x 10^6/l WBC-BF** s převahou MN. Při spontánní bakteriální peritonitidě je ve vzorku prokázáno > 250 x 10^6/l PMN [57].

3.6. Peritoneální dialyzát

Peritoneální dialýza je metoda, která umožňuje čištění krve uvnitř těla pacientů s terminálním selháním ledvin. Při této metodě se jako dialyzační membrána využívá peritoneum. Peritoneální membrána vytváří rozhraní mezi krví a peritoneální tekutinou, která se nachází uvnitř peritoneální dutiny. Bariéru peritoneálnímu transportu představuje endotel a bazální membrána kapilár, intersticium a mezotel [58].

Jak bylo popsáno v předchozí kapitole, peritoneum je semipermeabilní. Díky semipermeabilitě je umožněn transport vody a iontů. Transport probíhá na principu ultrafiltrace a difúze obousměrně mezi kapilárami peritonea a dialyzačním roztokem, který je přiveden do dutiny břišní katetrem. Rychlost transportu je závislá na molekulové hmotnosti, koncentračním gradientu a propustnosti peritonea [58].

3.6.1. Peritoneální dialyzační roztok

Peritoneální dialyzační roztoky mají stálé složení, obsahují elektrolyty, pufr a osmotické agens. Koncentrace elektrolytů musí odpovídat složení extracelulární tekutiny nebo korigovat poruchy elektrolytů vznikající v důsledku selhání ledvin. Obsahují proto Na^{+} (132 - 134 mmol/l), Cl^{-} (95 – 106 mmol/l), Ca^{2+} (1,25 - 1,75 mmol/l) a Mg^{2+} (0,25 - 0,75 mmol/l). Dialyzační roztoky obvykle neobsahují K^{+}, aby bylo dosaženo maximálního koncentračního gradientu v prevenci hyperkalémie [58].

Selhání ledvin je provázeno metabolickou acidózou, k jejíž korekci je do peritoneálního dialyzačního roztoku přidáván pufr. Jako pufr je používán laktát v koncentraci 35 - 40 mmol/l [58].

Konvenčně užívané dialyzační roztoky dále obsahují jako osmotické agens glukózu v koncentraci 1,36 - 4,25 %. Nyní se nově využívají i aminokyseliny nebo polymery glukózy [58].

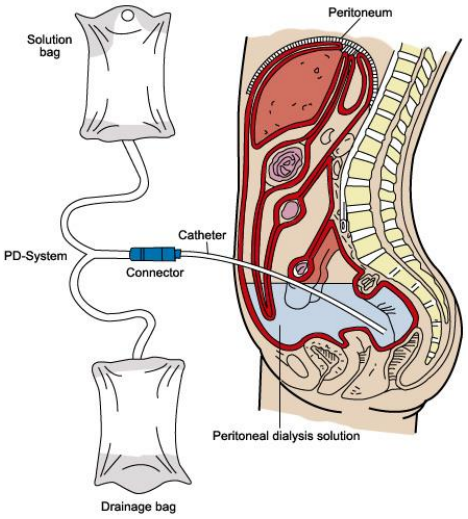
3.6.2. Peritoneální dialýza

Pro provedení peritoneální dialýzy je nejprve třeba chirurgicky zavést tzv. **Tenckhoffův peritoneální katetr** do peritoneální dutiny a nechat ho vrůst. Teprve poté může být zahájena peritoneální dialýza [58].

Na katetr si pacient napojí systém dvojitých vaků. Kdy je jeden vak naplněn dialyzačním roztokem a druhý je prázdný (Obr. 11). Pro úplnost je třeba doplnit, že objem jednoho vaku představuje nejčastěji 2000 ml [59].

Nejprve je provedeno vypuštění dialyzačního roztoku z dutiny břišní do prázdného vaku, a jakmile je dutina břišní prázdná, napustí se do ní z připojeného vaku nový dialyzační roztok, který je v dutině břišní ponechán 4 – 6 hodin. Nemocný tak provádí 3 - 5 výměn dialyzačního roztoku denně aseptickou technikou, ke které je speciálně edukován, přičemž poslední výměna je před spaním. Tento způsob provedení se nazývá **kontinuální ambulantní peritoneální dialýza (CAPD)**. Kromě krátké doby při výměně roztoku (asi 20 minut) je dialyzační roztok prakticky nepřetržitě v kontaktu s kapilárami peritonea a nemocný je tedy dialyzován kontinuálně, 24 hodin denně [58].

Výměny roztoku lze také zajistit pomocí přístroje – cycleru, který provádí sérii krátkých výměn v noci. Tato technika je označována jako **automatizovaná peritoneální dialýza (APD)**. Její výhodou je především to, že nemocný není omezován ve svých denních činnostech [60].



Obr. 11: Provedení peritoneální dialýzy [61]

Komplikací peritoneální dialýzy je především rozvoj peritonitidy, pro kterou je typická bolest břicha, teplota a vytékání zkaleného dialyzačního roztoku (dialyzátu) při výměně. Cytologicky je pak prokázán zvýšený počet leukocytů (> 100 x 10^6/l) a počet polymorfonukleárů > 50 % [62].

Mezi další závažné komplikace peritoneální dialýzy patří rozvoj metabolických problémů vyplývajících ze ztráty proteinů přes peritoneum do dialyzačního roztoku, případně resorpce nadměrně velkého množství glukózy z dialyzačního roztoku. Mezi další komplikace patří dislokace, zalomení, případně obstrukce katetru [58].

3.7. Synoviální tekutina

Synoviální klouby jsou nejpohyblivějšími klouby lidského těla, které převládají na končetinách a patří mezi diartrózy. Synoviální kloub umožňuje pohyblivé spojení dvou nebo více kostí, na jejichž koncích se nachází hyalinní chrupavka [63].

Pro synoviální klouby je typické, že obsahují kloubní dutinu, která je vystlána synoviální membránou a je vyplněná synoviální tekutinou. Na synoviální membránu navazuje husté kolagenní vazivo kloubního pouzdra. Některé synoviální klouby jsou zpevněny a zesíleny vazy. Mohou také obsahovat kloubní ploténku (*discus articularis*), neboli meniskus [63].

3.7.1. Vznik synoviální tekutiny

Synoviální tekutina je fyziologicky viskózní, mucinózní substance, která svým vzhledem připomíná vaječný bílek, odkud také dostala svůj název. Je velmi důležitá pro lubrikaci kloubních povrchů, čímž dochází ke snížení tření při pohybu. Synoviální tekutina je také důležitá pro výživu kloubních chrupavek a odstraňování produktů metabolismu [64].

Synoviální tekutina vzniká jako ultrafiltrát krevní plazmy z kapilár, které jsou fenestrované a dovolují propustit za fyziologických okolností pouze látky o malé molekulové hmotnosti. Například koncentrace kyseliny močové je v synoviální tekutině stejná jako v krevní plazmě [65].

Vzniklá tekutina je ještě modifikována sekreční aktivitou synovialocytů typu B, které doplní synoviální tekutinu o kyselinu hyaluronovou (HA). HA je vázaná na bílkoviny synoviální tekutiny, s nimiž vytváří obrovské komplexy. Samotná HA tvoří trojrozměrné prostorové sítě, které svojí hustotou omezují pohyb ostatních látek v roztoku a vytvářejí tenký film oddělující třecí povrchy kloubních chrupavek. Tření tak probíhá přímo v lubrikační vrstvě a kloubní povrchy jsou více chráněny. Za fyziologických okolností se kloubní povrchy po sobě pohybují třením, které přibližně odpovídá tření dvou kousků ledu [66, 67].

Resorpce synoviální tekutiny je zajišťována lymfatickými cévami, které začínají v subintimě synoviální membrány slepě [65].

3.7.2. Tvorba kloubního výpotku

Pokud dojde k narušení rovnováhy mezi tvorbou a resorpcí synoviální tekutiny, vzniká kloubní výpotek, jehož následkem je mechanické tlačení na intimu synoviální membrány a to se projeví ve snížené produkci HA. Při zánětlivých proces dochází navíc ještě k uvolnění hyaluronidázy z lysozomů PMN. Hyaluronidáza degraduje HA a to vede ke snížení viskozity synoviální tekutiny. Důsledkem těchto změn je pak obvykle poškození kloubních chrupavek [65, 67].

Podle příčiny je možno rozlišovat nezánětlivé, zánětlivé, krystaly indukované, septické a hemoragické poruchy synoviálních kloubů, jak popisuje Tab. 4 [64].

Fyziologicky je synoviální tekutina čirá a bezbarvá, event. mírně nažloutlá, která je v kloubní dutině ve velmi malém množství. Literatura udává, že se v kolenním kloubu, který patří mezi největší synoviální klouby, nachází 0,2 – 4,0 ml synoviální tekutiny [66].

V přesném počtu leukocytů se literatura liší. Dle Mundta a Shanahana je fyziologicky přítomno **0 – 150 x 10^6/l WBC-BF**, přičemž je méně než 25 % PMN. Turgeon, M. T. udává, že je fyziologický počet WBC-BF v synoviální tekutině **< 200 x 10^6/l** [64, 68].

3.7.3. Arthrocentéza

Synoviální tekutina je odebírána tzv. **arthrocentézou**, která je prováděna z diagnostických nebo terapeutických důvodů. Diagnosticky slouží k odhalení příčiny vzniku synoviálního výpotku. Terapeuticky je prováděna za účelem snížení intraartikulárního tlaku a tím bolestivosti kloubu, dále k drenáži septické nebo krystaly obsahující tekutiny, případně k podání léčivých preparátů do kloubní dutiny [69].

K provedení arthrocentézy je třeba znát anatomický popis daného kloubu. Athrocentéza je prováděna za sterilních podmínek a je doporučeno před punkcí aplikovat lokální anestetikum do podkoží. Hlubší podání až do kloubní dutiny může způsobit interakci se synoviální tekutinou a ovlivnit výsledky vyšetření [69].

Před vpichem punkční jehly je třeba kůži napnout, opatrně proniknout do kloubní dutiny (viz Obr. 12) a aspirovat synoviální tekutinu. Pokud dojde ke kontaktu s kostí, je nutné jehlu povytáhnout a vést ji v jiném směru. Pro diagnostické účely je aspirováno přibližně 5 ml synoviální tekutiny. Při terapeutické punkci je odstraněna veškerá synoviální tekutina. Pokud je původní injekční stříkačka již plná (nebo je třeba

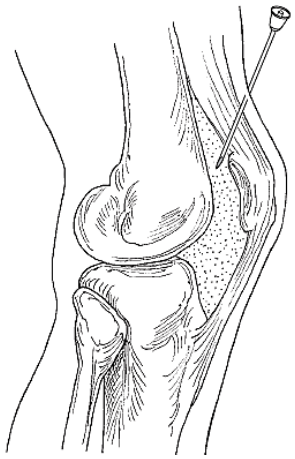
aplikovat léčivo), je pouze injekční stříkačka vyměněna a jehla je až do konce arthrocentézy ponechána v kloubní dutině. Nakonec je místo punkce ošetřeno sterilní gázou, která je stlačena a poté vyměněna za elastické obinadlo [69].

Z makroskopického hlediska můžeme po posouzení barvy, zákalu a viskozity vzorku pomýšlet na charakter výpotku již při samotném odběru – viz Tab. 4 [64].

Viskozita synoviální tekutiny se testuje pomocí tzv. **String testu**, kdy je po arthrocentéze z injekční stříkačky odejmuta jehla a při evakuaci tekutiny do zkumavky je pozorováno, jak dlouhé viskózní vlákno bude tekutina vytvářet. Fyziologicky tvoří přibližně 5 cm dlouhé. Za patologických stavů se tvoří vlákno kratší než 3 cm [64].

Synoviální tekutina je odesílána na vyšetření v množství 2 ml ve zkumavce, která obsahuje jako protisrážlivý roztok K_3EDTA nebo lithium heparin. Nevýhodou K_3EDTA je interakce s případnými krystaly, jako je např. kalcium pyrofosfát [70].

Laboratorně jsou vysoce viskózní vzorky obtížně stanovitelné. Pro snadnou aspiraci vzorku do automatického analyzátoru se ke stanovovanému vzorku přidává enzym hyaluronidáza. Po přidání přibližně 400 U hyaluronidázy k 1 ml viskózní synoviální tekutiny je vzniklá směs inkubována 10 minut při 37 °C [71, 72].



Obr. 12: Provedení arthrocentézy kolenního kloubu [64]

Tab. 4: Klasifikace synoviální tekutiny [64]

Synoviální tekutina	Vzhled	Viskozita	Cytologie
Fyziologická	Bezbarvá či lehce nažloutlá, čirá	Vysoká	< 150 x 10^6/l WBC-BF < 25 % PMN
Nezánětlivá	Žlutá, slabě zakalená	Snížená	≤ 1 000 x 10^6/l WBC-BF < 30 % PMN
Zánětlivá	Bílá, šedá nebo žlutá, zakalená	Není	< 100 000 x 10^6/l WBC-BF > 50 % PMN
Septická	Bílá, šedá, žlutá nebo zelená, zakalená	Není	50 000 – 200 000 x 10^6/l WBC-BF > 90 % PMN
Krystaly indukovaná	Bílá, zakalená	Není	50 000 – 200 000 x 10^6/l WBC-BF < 90 % PMN
Hemoragická	Červená, xantochromní nebo hnědá, zakalená	Není	50 – 10 000 x 10^6/l WBC-BF < 50 % PMN Přítomnost erytrocytů

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Kontrola kvality

V období od 20. 1. – 20. 4. 2011 byl na analyzátoru XT-4000i měřen denně kontrolní materiál Cell - Chex Auto firmy Sysmex ve dvou hladinách (L1, L2). Použitý materiál, reagencie i pracovní postup pro provedení analýzy na analyzátoru XT – 4000i jsou uvedeny v kapitole 4.4.1.

Naměřené hodnoty byly statisticky vyhodnoceny v počítači v programu Microsoft Excel, zaznamenány do tabulky a porovnány s údaji, které uvádí výrobce. V obou hladinách byla zjišťována preciznost měření za podmínek opakovatelnosti a reprodukovatelnosti, a také pravdivost (správnost).

4.2. Linearita měření

Pro zjištění linearity měření byl použit vzorek peritoneálního dialyzátu, který byl měřen dne 18. 7. 2013 na analyzátoru XT-4000i. Ze získané hodnoty WBC-BF byly spočítány teoretické hodnoty WBC-BF po naředění vzorku dvojkovým ředěním. Každý takto připravený alikvot byl měřen na analyzátoru XT-4000i a z výsledků byl na počítači v programu Microsoft Excel sestrojen graf. Vytvořený graf dokazoval, zda měření probíhalo lineárně.

Pomůcky: stojánek na zkumavky, plastové zkumavky, odpadní nádoba, automatická pipeta (20 – 200 µl), špičky k pipetě, latexové rukavice, automatický analyzátor XT - 4000i, počítač.

Reagencie: viz Tab. 5

Postup přípravy alikvotů:

- Do 11 plastových zkumavek bylo pipetováno 100 µl Cellpacku.
- Ze vzorku peritoneálního dialyzátu bylo pipetováno 100 µl alikvotu do první zkumavky. Vzniklá směs byla promíchána.
- Z první zkumavky bylo pipetováno 100 µl alikvotu do druhé, promícháno a tímto postupem postupně pipetováno do poslední zkumavky.
- Z poslední zkumavky bylo pipetováno 100 µl alikvotu do odpadní nádobky.

4.3. Stabilita BF

Pro měření stability BF byl vybrán vzorek peritoneálního dialyzátu, který byl alikvotován do dvou plastových zkumavek. Z nichž jedna zkumavka byla uložena do chladničky v koagulační laboratoři při teplotě 6,9 °C a druhá byla uložena do stojánku na zkumavky v hematologické laboratoři při teplotě 21,7 °C.

V pravidelných intervalech 5 hodin bylo provedeno měření obou vzorků BF na analyzátoru XT-4000i a výsledky zaznamenány do tabulky a graficky zhodnoceny. Měření peritoneálního dialyzátu bylo uskutečněno 17. 6. 2013.

4.4. Korelace výsledků analýzy BF

V období od 6. 6. - 17. 9. 2013 byly porovnávány výsledky analýzy BF z automatického analyzátoru XT - 4000i s výsledky mikroskopického vyšetření ve Fuchs-Rosenthalově počítací komůrce. K hodnocení byla použita lineární regrese a statistické hodnocení bylo doplněno použitím párového t-testu.

Celkem bylo stanoveno 52 vzorků BF od pacientů - z toho 26 vzorků likvorů, 18 vzorků výpotků a 8 vzorků peritoneálních dialyzátů.

4.4.1. Vyšetření BF na automatickém analyzátoru XT - 4000i

Celkový počet buněk v BF byl zjištěn ve speciálním módu „Body fluids“ pomocí automatického analyzátoru XT - 4000i od firmy Sysmex tímto způsobem:

- Na analyzátoru byl zvolen mód „Body fluids“ a po promytí analyzátoru na nulové pozadí přístroje bylo zadáno laboratorní číslo vyšetřovaného vzorku BF.
- Bezprostředně před analýzou byl vzorek BF ve zkumavce ještě několikrát promíchán, aspirován a měřen v otevřeném systému.
- Změřením BF byl zjištěn:
  - počet leukocytů: **WBC-BF**
  - počet erytrocytů: **RBC-BF**
  - relativní počet mononukleárů: **MN%** a polymorfonukleárů: **PMN%**
  - absolutní počet mononukleárů: **MN#** a polymorfonukleárů: **PMN#**
  - počet eozinofilů: **EO-BF**
  - počet buněk s vysokou intenzitou fluorescence: **HF-BF**

- Vzorky, u kterých byly po změření zjištěny tzv. bílé scattergramy, byly opakovaně měřeny po ředění Cellpackem (1 : 9) a výsledky pak násobeny patřičným ředěním.
- Výsledky WBC-BF, RBC-BF a absolutní počty MN a PMN byly porovnány s mikroskopickými.

Použitý materiál: plastová zkumavka, stojánek na zkumavky, latexové rukavice, gáza, Pasteurovy pipety, automatické pipety (20 - 200 µl a 100 – 1000 µl), špičky na pipety, odpadní nádoba, automatický analyzátor XT - 4000i (Sysmex).

Reagencie: byly použity originální validované reagencie firmy Sysmex pro hematologický analyzátor XT - 4000i – blíže viz Tab. 5.

Tab. 5: Reagencie pro hematologický analyzátor XT - 4000i

Název reagencie (XT - 4000i)	Velikost balení	Číslo šarže	Expirace
CELLPACK	20 l	D 3192	14. 10. 2014
CELLSHEAT	20 l	D 3002	21. 7. 2014
STROMATOLYSER-FB	5 l	D 3019	17. 4. 2014
STROMATOLYSER-4DL	5 l	D 3013	27. 3. 2014
STROMATOLYSER-4DS	42 ml	D 3012	9. 4. 2014
STROMATOLYSER-NR (L) lyse reagent	1000 ml	ZA 2063	15. 10. 2013
STROMATOLYSER-NR (S) dye solution	12 ml		
STROMATOLYSER-IM	10 l	D 3013	20. 3. 2014
CELLCLEAN	50 ml	A 2002	25. 1. 2013

4.4.2. Mikroskopické vyšetření BF ve Fuchs-Rosenthalově počítací komůrce

Celkový počet buněk v BF byl zjištěn pomocí Fuchs-Rosenthalovy počítací komůrky a optického mikroskopu. Vyšetřovaný vzorek BF byl analyzován tímto způsobem:

- Do plastové zkumavky byl pipetován vzorek BF a roztok 0,2 % krystalové violeti v poměru 9:1. Tedy 450 µl BF a 50 µl krystalové violeti.
- Vzniklá směs byla promíchána Pasteurovou pipetou a inkubována 2 - 5 minut.
- Postranní lišty Fuchs-Rosenthalovy komůrky byly zvlhčeny destilovanou vodou a nasazeno krycí sklíčko. O správném nasazení krycího sklíčka svědčily Newtonovy kroužky.
- Pasteurovou pipetou pak byla naplněna připravená počítací komůrka. Do prvního počítacího sektoru byl pipetován nativní, nebarvený vzorek pro zjištění počtu erytrocytů, a do druhého sektoru obarvený vzorek pro zjištění počtu leukocytů. Při naplnění počítací komůrky bylo dbáno na to, aby se nevytvořily vzduchové bubliny pod krycím sklíčkem a BF nepřetékala přes obvodové kanálky.
- V optickém mikroskopu firmy Zeizz byl zjištěn počet erytrocytů a leukocytů v celém objemu počítací komůrky při zvětšení 400x. Při počítání leukocytů bylo možné podle vzhledu jádra rozlišit, zda se jedná o PMN nebo MN.
- Výsledné hodnoty erytrocytů a leukocytů byly spočítány v 3,2 µl. Nakonec bylo provedeno přepočítání buněk na 1 µl.

Použitý materiál: plastová zkumavka, stojánek na zkumavky, gáza, latexové rukavice, odpadní nádoba, Pasteurova pipeta, automatické pipety (20 - 200 µl a 100 - 1000 µl), špičky k pipetám, krycí sklíčko, Fuchs-Rosenthalova počítací komůrka, optický mikroskop firmy Zeiss.

Reagencie: destilovaná voda, 0,2 % roztok krystalové violeti (připraven Lékárnou Pardubické krajské nemocnice, a.s.).

5. VÝSLEDKY

5.1. Kontrola kvality

Statistickým zpracováním naměřených dat kontrolního materiálu Cell-Chex Auto L1 i L2 byly zjištěny: průměrné hodnoty, směrodatné odchylky a variační koeficienty (CV) pro parametr WBC-BF a RBC-BF.

Variační koeficienty byly porovnány s hodnotami variačních koeficientů, které uvádí výrobce. Z naměřených dat kontrolního materiálu byla také zjištěna pravdivost WBC-BF a RBC-BF, jak dokládá Tab. 6 - 8.

Tab. 6: Preciznost za podmínek opakovatelnosti

Cell-Chex Auto	**Preciznost za podmínek opakovatelnosti**		
	CV [%]		
Hodnocený parametr	**WBC-BF**	**RBC-BF**	**Číslo šarže**
L1	9,15	1,82	03400418
L2	5,16	1,46	03400419
Deklarovaná hodnota	**≤ 30,0**	**≤ 40,0**	Expirace: 18. 2. 2011

Tab. 7: Preciznost za podmínek reprodukovatelnosti

Cell-Chex Auto	**Preciznost za podmínek reprodukovatelnosti**		
	CV [%]		
Hodnocený parametr	**WBC-BF**	**RBC-BF**	**Číslo šarže**
L1	7,0	9,6	03400418
L2	7,1	8,0	03400419
Deklarovaná hodnota	**≤ 30,0**	**≤ 40,0**	Expirace: 18. 2. 2011

Tab. 8: Pravdivost

Cell-Chex Auto	**Pravdivost**		
	BIAS [%]		
Hodnocený parametr	**WBC-BF**	**RBC-BF**	**Číslo šarže**
L1	5,89	-2,39	03400418
L2	6,24	2,83	03400419
Deklarovaná hodnota	**≤ ± 10,0**	**≤ ± 10,0**	Expirace: 18. 2. 2011

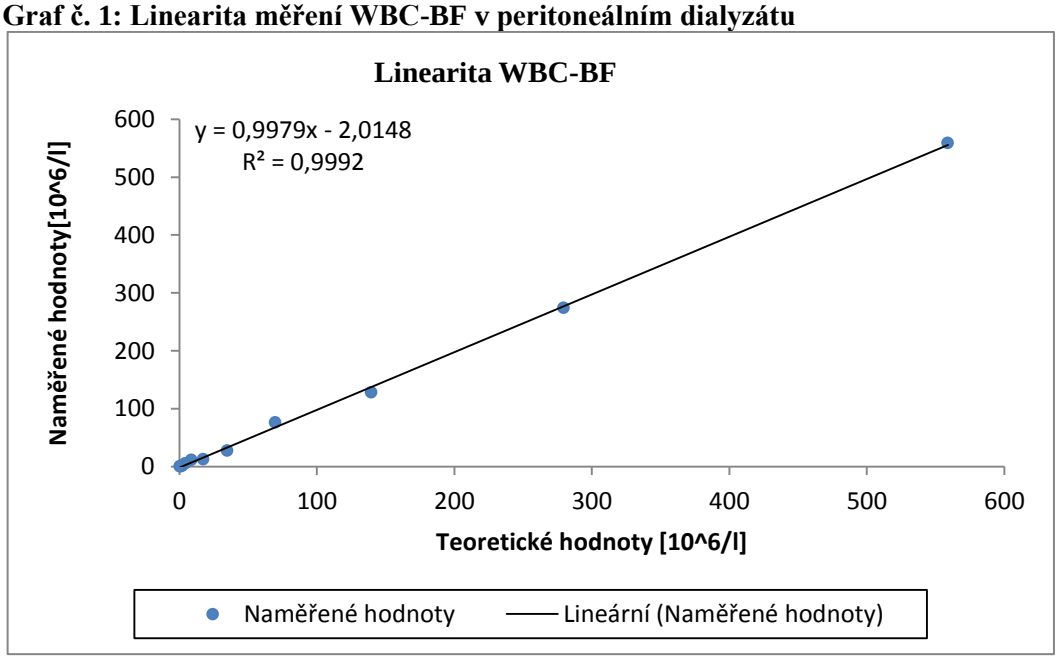
5.2. Linearita měření

Z teoretických a naměřených hodnot WBC-BF, jak je znázorněno v Tab. 9, bylo provedeno grafické hodnocení linearity měření – viz Graf č. 1.

Tab. 9: Linearita WBC-BF

Zkumavka	Teoretické výpočty	Naměřené hodnoty
	10^6/l	10^6/l
1	559	559
2	280	274
3	140	128
4	70	76
5	35	27
6	17	12
7	9	11
8	4	5
9	2	1
10	1	0
11	1	0

Graf č. 1: Linearita měření WBC-BF v peritoneálním dialyzátu



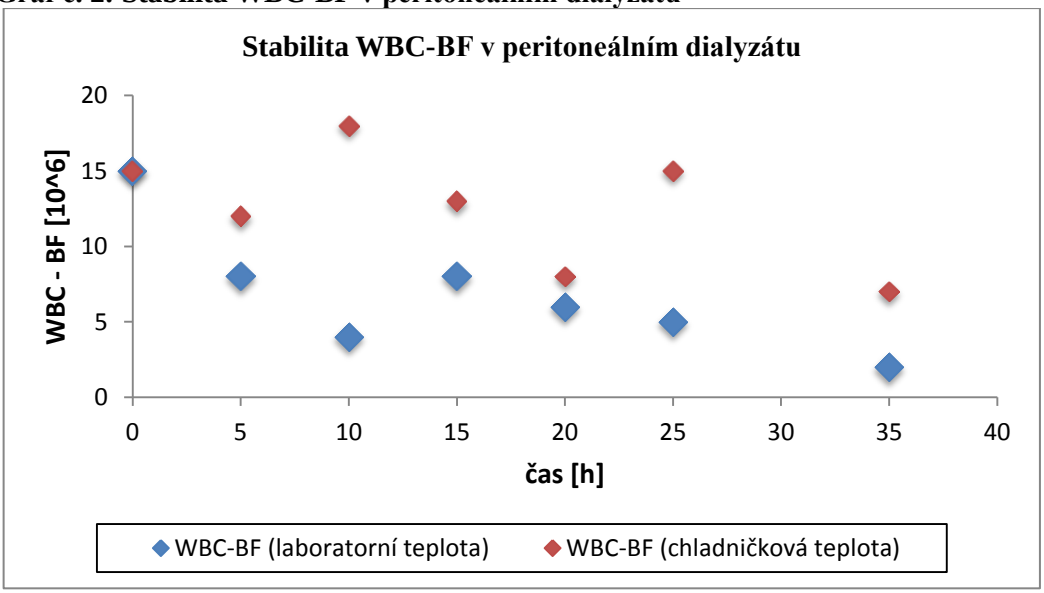
5.3. Stabilita BF

Z naměřených dat WBC-BF v peritoneálním dialyzátu bylo provedeno porovnání - viz Graf č. 2. Jak je z Tab. 10 patrné, měření nebylo možné uskutečnit po 30 hodinách z provozních důvodů.

Tab. 10: WBC-BF v peritoneálním dialyzátu

čas [h]	WBC-BF	
	laboratorní teplota	chladničková teplota
	[10^6/l]	[10^6/l]
0	**15**	**15**
5	**8**	**12**
10	**4**	**18**
15	**8**	**13**
20	**6**	**8**
25	**5**	**15**
35	**2**	**7**

Graf č. 2: Stabilita WBC-BF v peritoneálním dialyzátu



5.4. Korelace výsledků analýzy BF

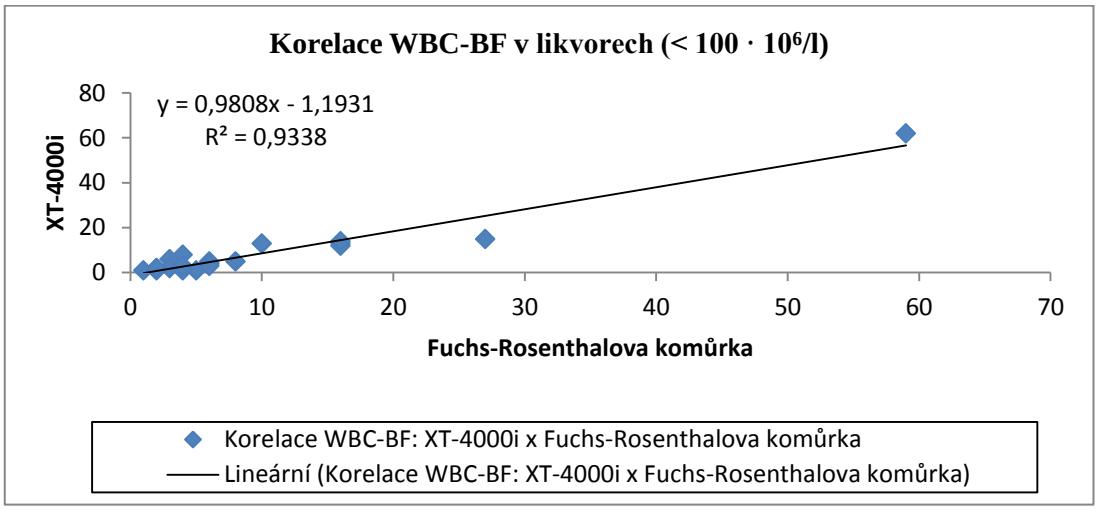
Výsledky analýzy byly zaznamenány do přehledných tabulek (viz Tab. 11 – 13) podle typu BF na počítači v programu Microsoft Excel a vyhodnoceny pomocí lineární regrese. Pro větší objektivnost byly vždy zvlášť hodnoceny méně buněčné a více buněčné vzorky (viz Graf č. 3 – 26). Rozdělení do těchto dvou skupin bylo zvoleno vzhledem k naměřeným hodnotám na XT – 4000i.

Získaný korelační koeficient byl porovnán s korelačním koeficientem, který uvádí výrobce analyzátoru XT – 4000i. V manuálu k přístroji výrobce uvádí, že pro WBC-BF je $R^2 \geq 0{,}9$, pro RBC-BF $R^2 \geq 0{,}8$, pro MN $R^2 \geq 0{,}9$ a PMN $R^2 \geq 0{,}9$. Toto statistické hodnocení bylo doplněno použitím párového t-testu (viz Tab. 14 - 16), hladina významnosti byla 0,05 [9].

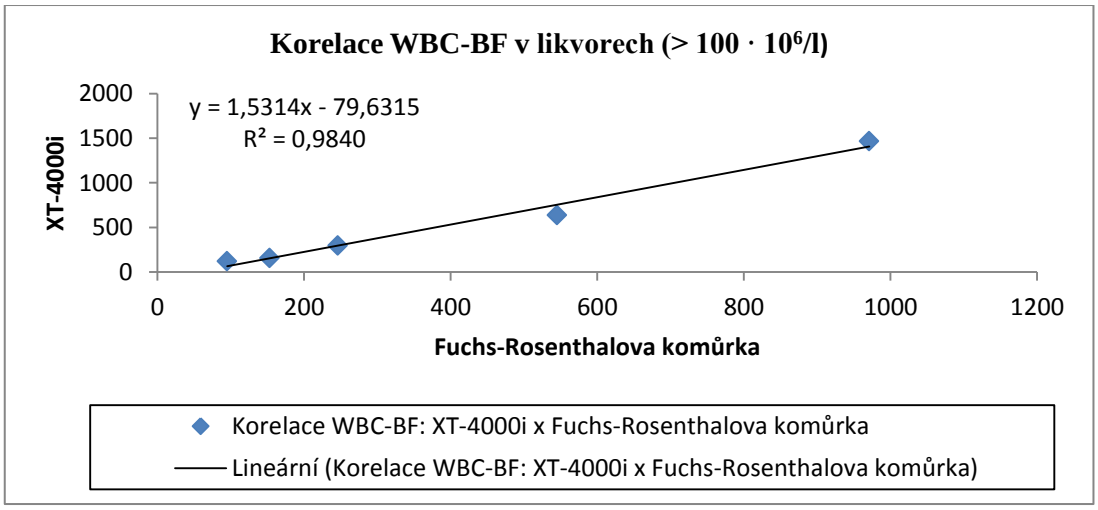
Tab. 11: Korelace analýzy CSF

KORELACE BF	WBC-BF [x 10^6/l]		RBC-BF [x 10^6/l]		MN [x 10^6/l]		PMN [x 10^6/l]	
Datum měření	XT-4000i	Fuchs-Rosenthalova komůrka	XT-4000i	Fuchs-Rosenthalova komůrka	XT-4000i	Fuchs-Rosenthalova komůrka	XT-4000i	Fuchs-Rosenthalova komůrka
6.6.2013	5	6	0	1	4	5	1	1
7.6.2013	121	95	0	77	70	81	51	14
17.6.2013	2	2	0	10	1	2	1	0
4.7.2013	15	27	1000	483	14	26	1	1
8.7.2013	13	16	0	8	5	6	8	10
8.7.2013	1	5	0	2	0	2	1	3
9.7.2013	4	6	0	4	2	5	2	1
10.7.2013	12	16	3000	2792	2	3	10	13
10.7.2013	14	16	0	0	12	15	2	1
23.7.2013	13	10	0	4	10	7	3	3
24.7.2013	296	246	0	5	262	207	34	39
24.7.2013	4	6	0	2	1	2	3	4
24.7.2013	1467	971	0	15	1452	963	15	8
30.7.2013	6	3	0	14	6	3	0	0
30.7.2013	62	59	0	16	48	41	14	18
31.7.2013	2	3	0	4	2	2	0	1
31.7.2013	5	8	1000	816	3	4	2	4
1.8.2013	8	4	0	4	4	3	4	1
12.8.2013	3	6	0	4	3	5	0	1
13.8.2013	1	1	0	1	0	0	1	1
30.8.2013	639	545	0	255	298	251	341	294
10.9.2013	1	4	0	10	1	3	0	1
11.9.2013	1	2	0	1	0	0	1	2
11.9.2013	2	2	0	19	2	2	0	0
11.9.2013	157	153	0	16	146	129	11	24
16.9.2013	3	4	0	2	2	3	1	1

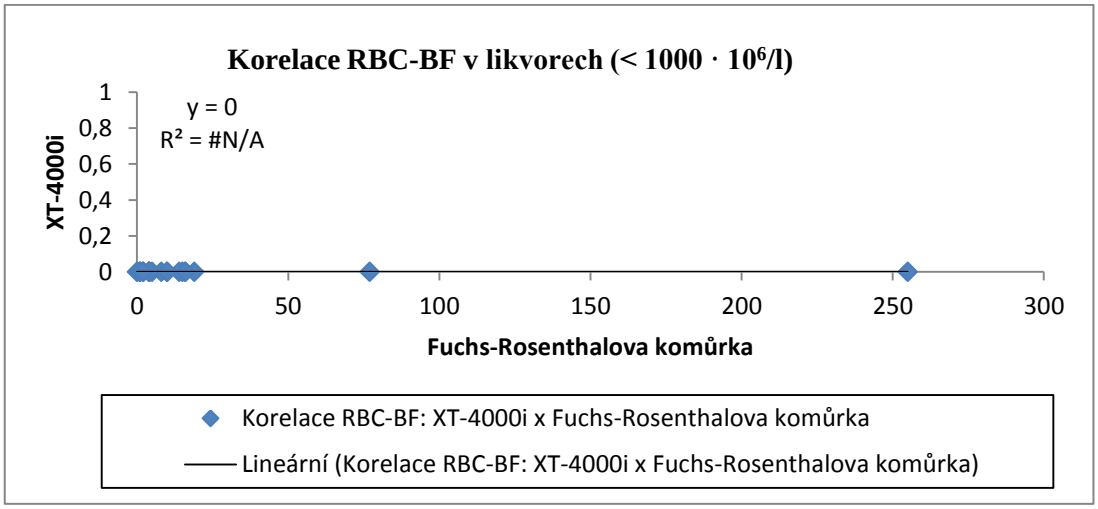
Graf č. 3: Korelace WBC-BF v likvorech (< 100 · 10^6/l)



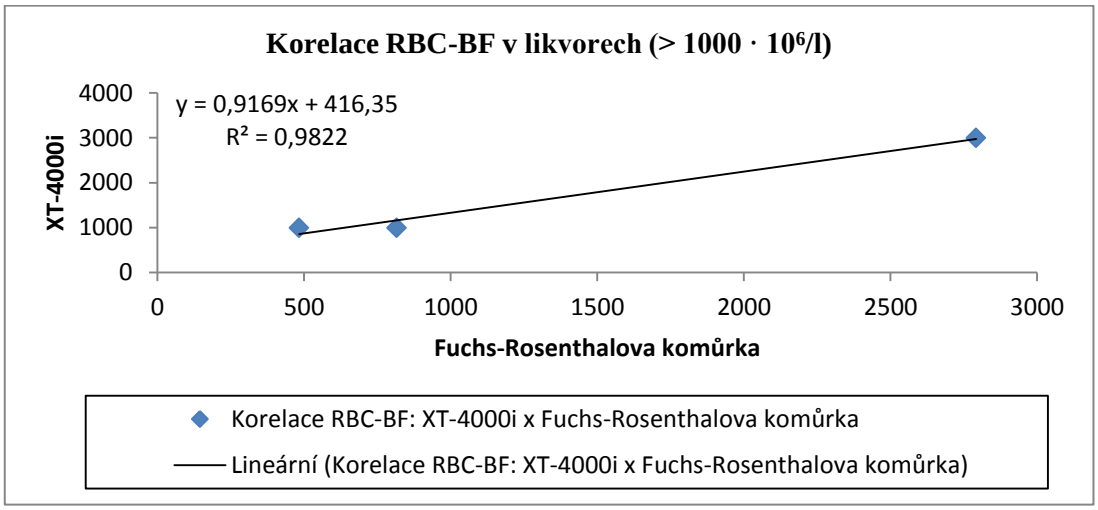
Graf č. 4: Korelace WBC-BF v likvorech (> 100 · 10^6/l)



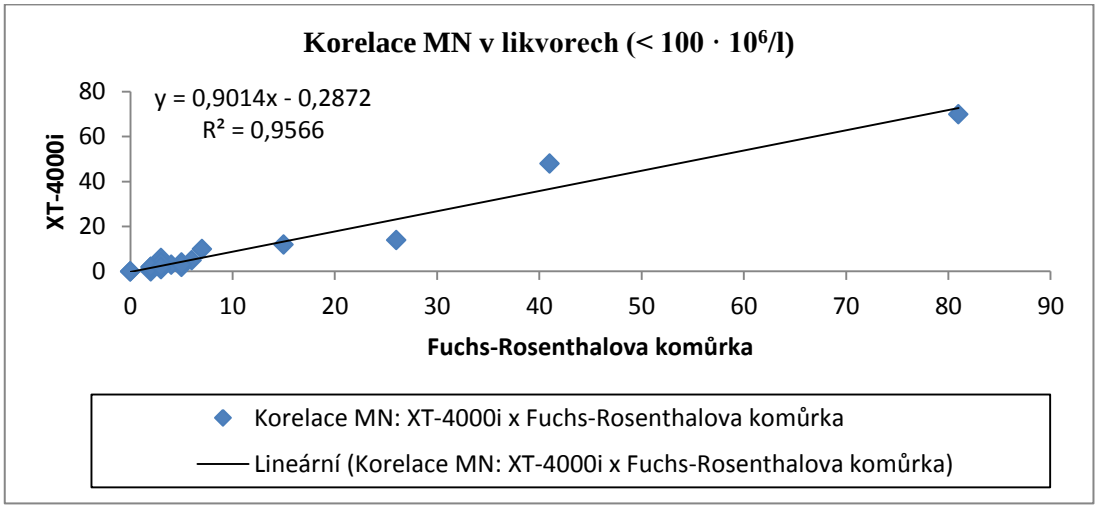
Graf č. 5: Korelace RBC-BF v likvorech (< 1000 · 10^6/l)



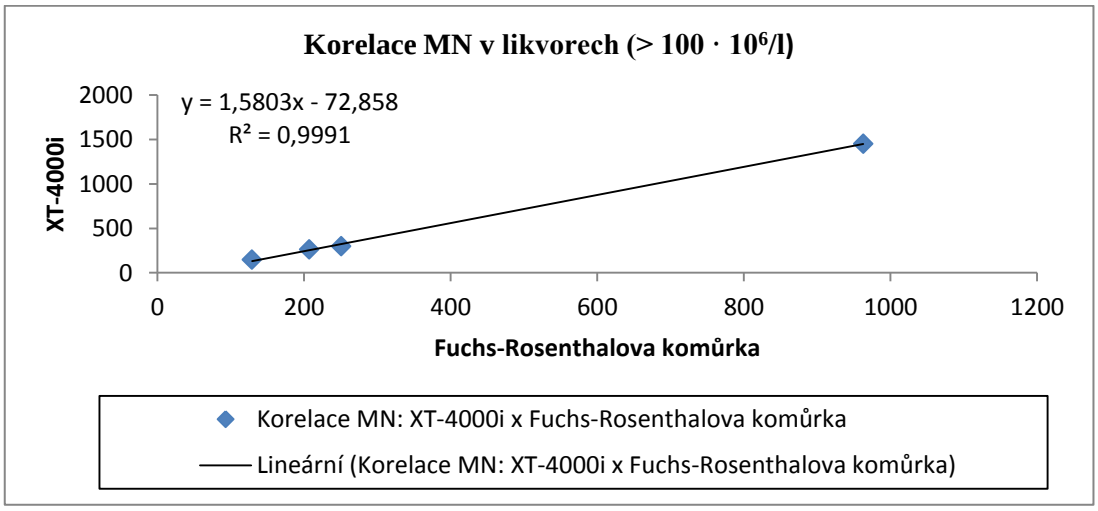
Graf č. 6: Korelace RBC-BF v likvorech (> 1000 · 10^6/l)



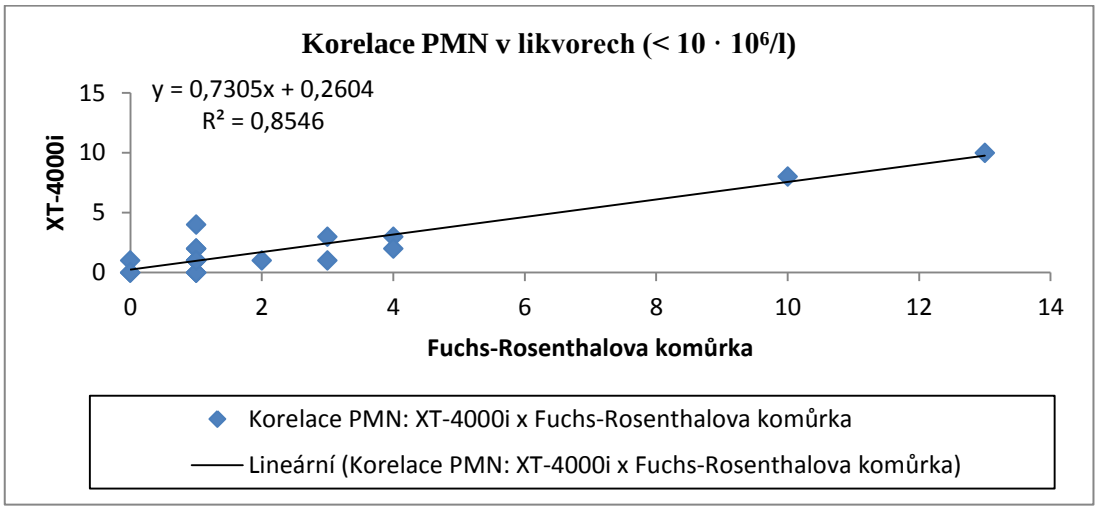
Graf č. 7: Korelace MN v likvorech (< 100 · 10^6/l)



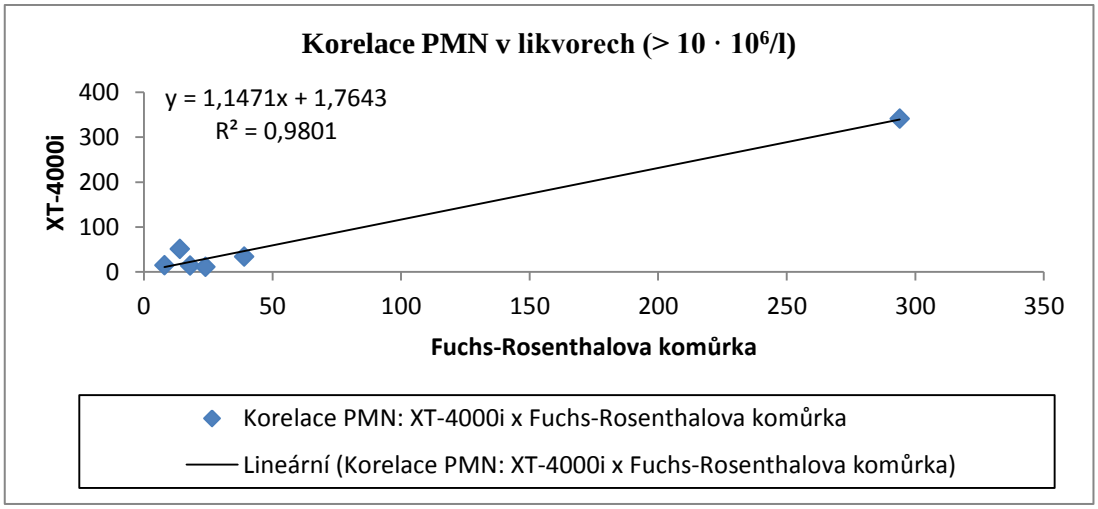
Graf č. 8: Korelace MN v likvorech (> 100 · 10^6/l)



Graf č. 9: Korelace PMN v likvorech (< 10 · 10^6/l)



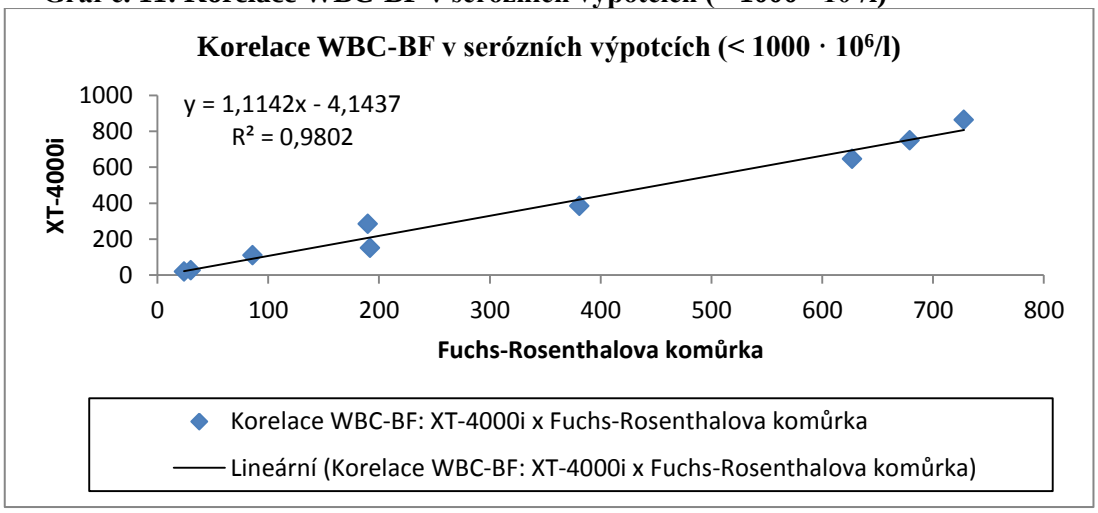
Graf č. 10: Korelace PMN v likvorech (> 10 · 10^6/l)



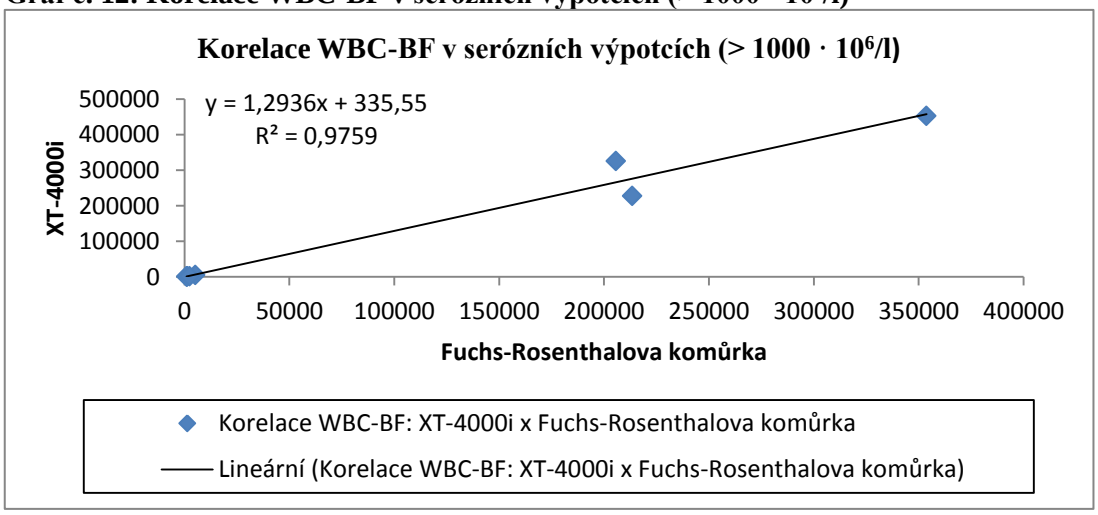
Tab. 12: Korelace analýzy serózních výpotků

KORELACE BF	WBC-BF x 10^6/l		RBC-BF x 10^6/l		MN x 10^6/l		PMN x 10^6/l	
datum	XT-4000i	Fuchs-Rosenthalova komůrka	XT-4000i	Fuchs-Rosenthalova komůrka	XT-4000i	Fuchs-Rosenthalova komůrka	XT-4000i	Fuchs-Rosenthalova komůrka
6.6.2013	385	381	1000	908	377	374	8	7
10.6.2013	5150	5120	13000	11320	4632	4650	518	470
17.6.2013	1400	1370	28000	24940	1339	1230	61	140
18.6.2013	452800	353716	100000	271000	171600	84186	281200	269530
3.7.2013	151	192	1000	146	150	166	1	26
15.7.2013	1065	1014	4000	3458	1013	953	52	61
15.7.2013	646	627	2000	1801	611	549	35	78
19.7.2013	1114	1185	12000	10014	948	813	166	372
23.7.2013	326000	205700	200000	141000	132400	153000	193600	152700
30.7.2013	863	728	10000	9748	764	652	99	76
13.8.2013	284	190	0	78	271	178	13	12
13.8.2013	26	30	38000	69	1	2	25	28
15.8.2013	750	679	20000	15316	676	565	74	114
15.8.2013	1407	1094	40000	41984	965	980	442	114
19.8.2013	227678	213500	52000	47800	13794	18500	213884	195000
30.8.2013	2016	2388	3000	3072	1041	1620	975	768
30.8.2013	20	24	1000	774	2	3	18	21
10.9.2013	110	86	0	41	95	79	15	7

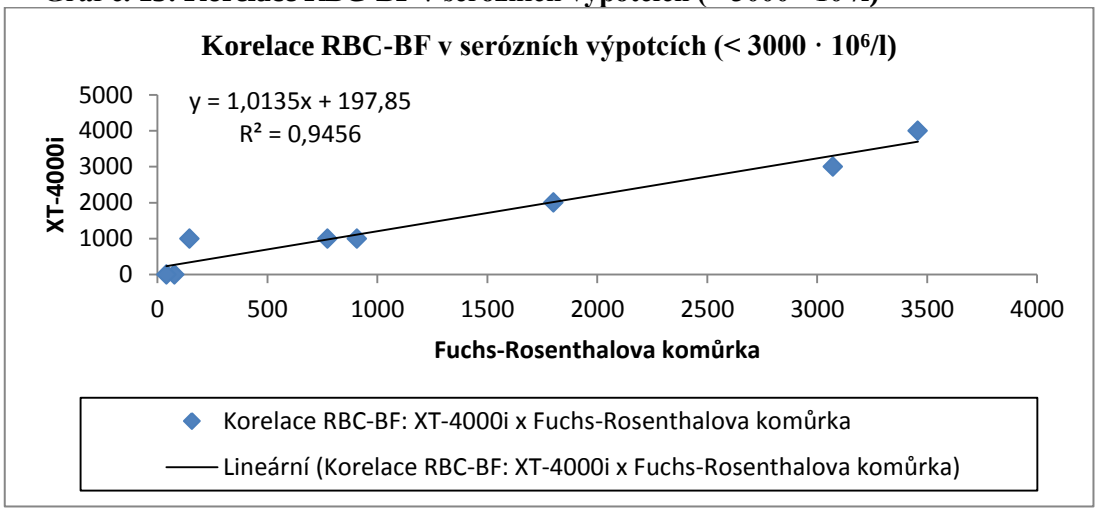
Graf č. 11: Korelace WBC-BF v serózních výpotcích (< 1000 · 10^6/l)



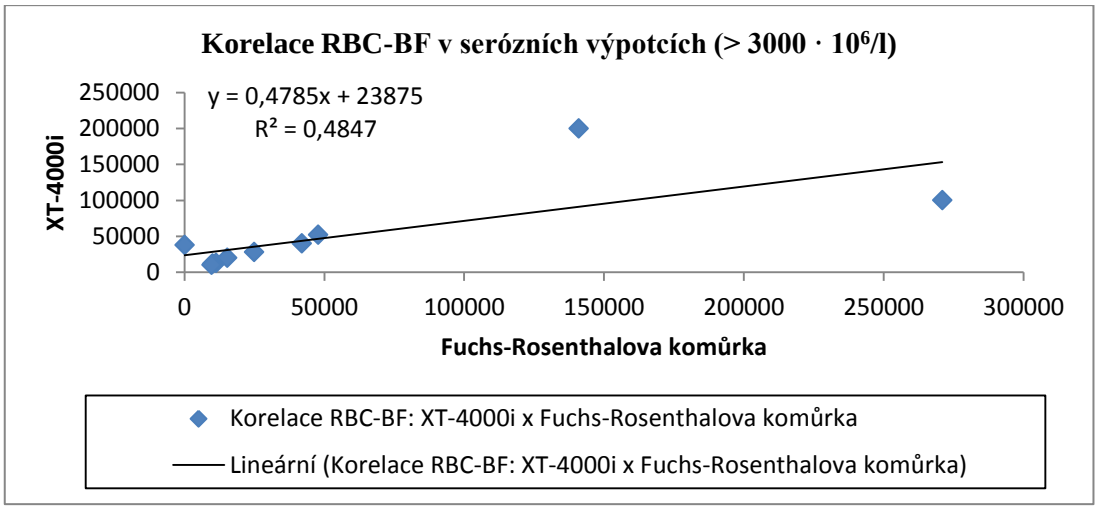
Graf č. 12: Korelace WBC-BF v serózních výpotcích (> 1000 · 10^6/l)



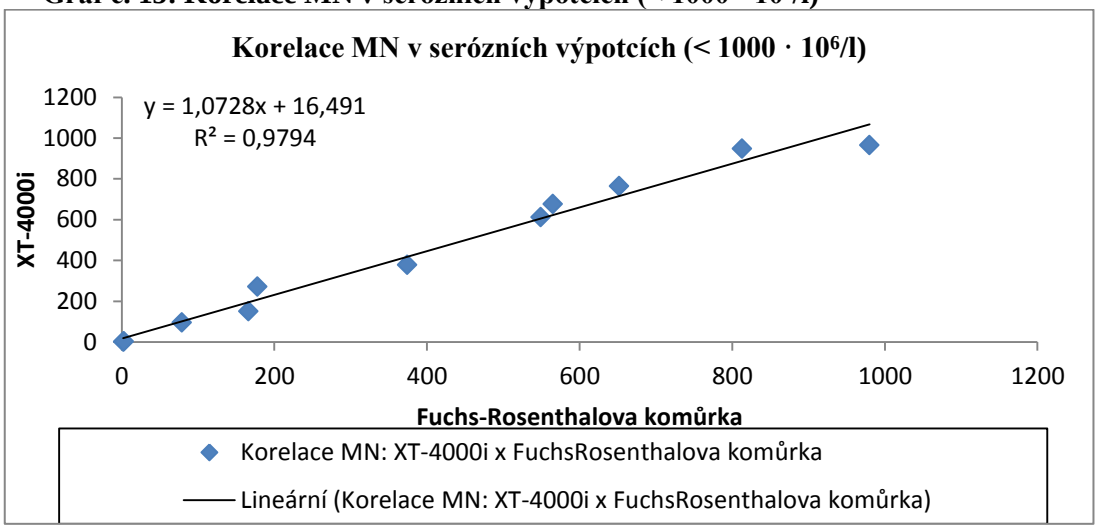
Graf č. 13: Korelace RBC-BF v serózních výpotcích (< 3000 · 10^6/l)



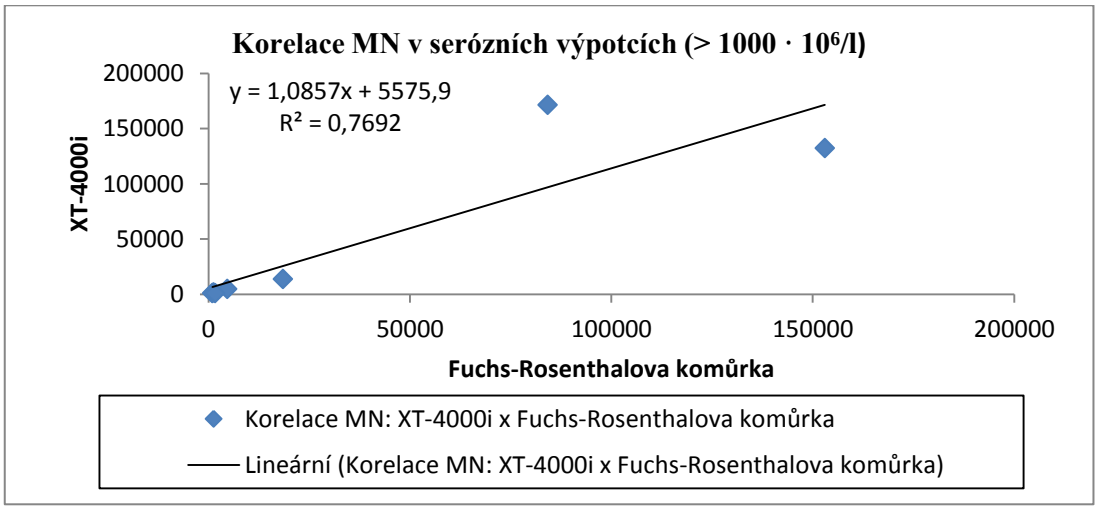
Graf č. 14: Korelace RBC-BF v serózních výpotcích (> 3000 · 10^6/l)



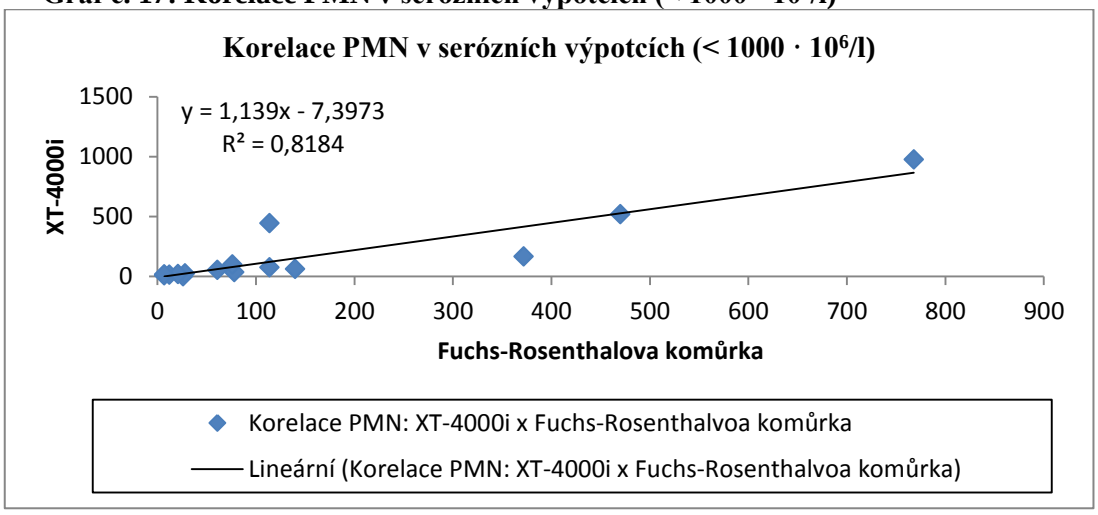
Graf č. 15: Korelace MN v serózních výpotcích (< 1000 · 10^6/l)



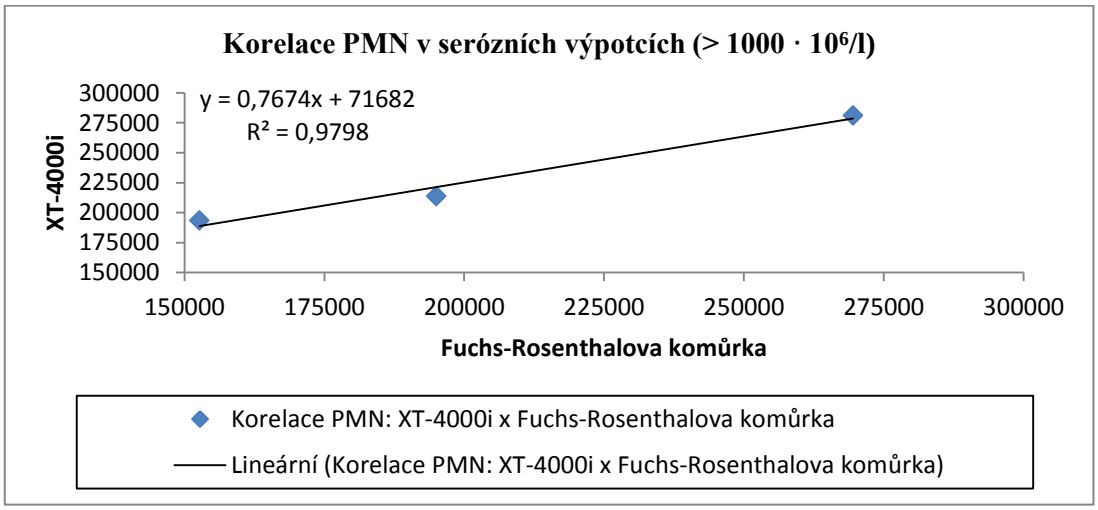
Graf č. 16: Korelace MN v serózních výpotcích (> 1000 · 10^6/l)



Graf č. 17: Korelace PMN v serózních výpotcích (< 1000 · 10^6/l)



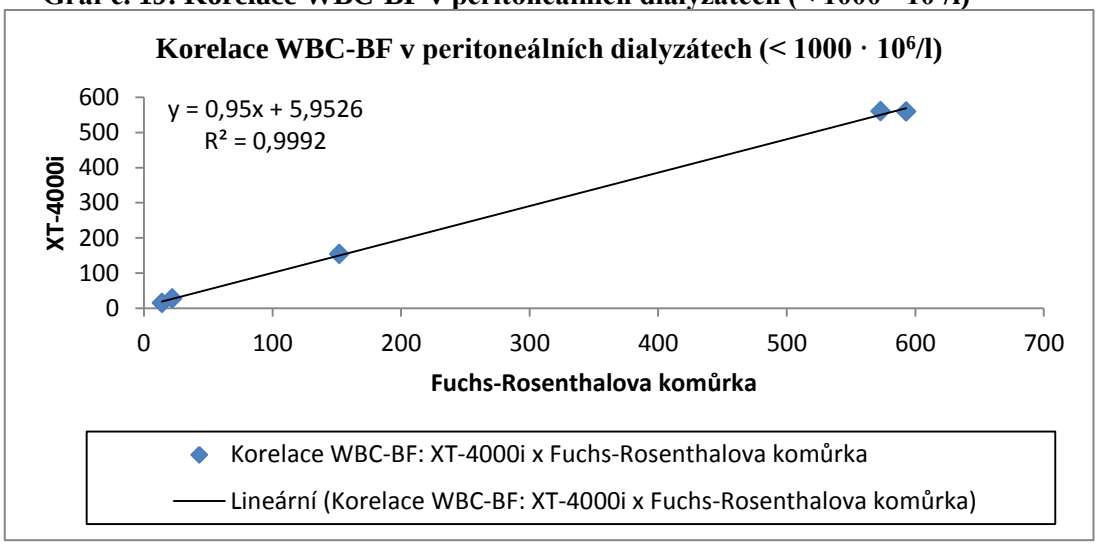
Graf č. 18: Korelace PMN v serózních výpotcích (> 1000 · 10^6/l)



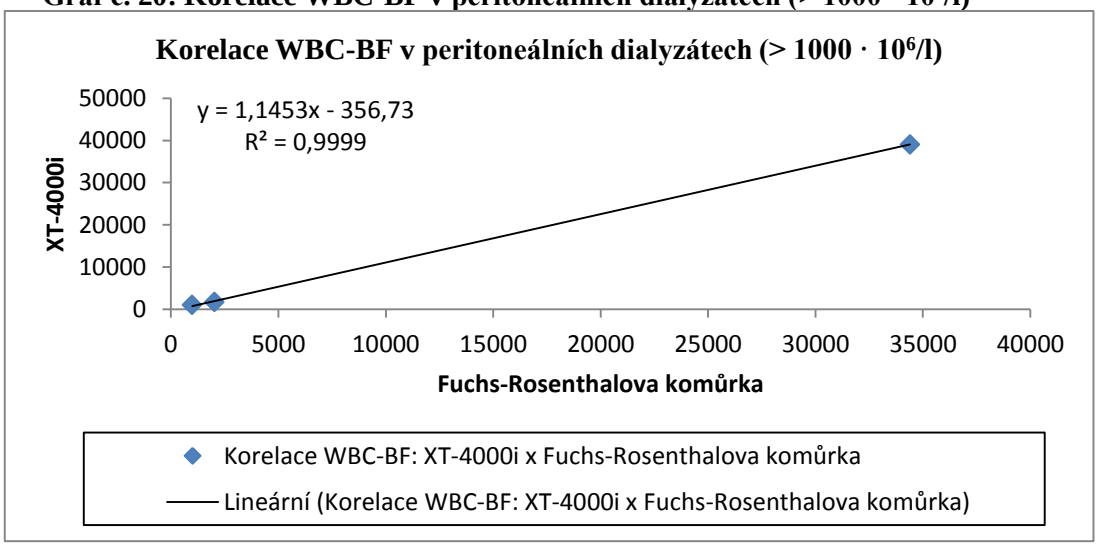
Tab. 13: Korelace analýzy peritoneálních dialyzátů

KORELACE BF	WBC-BF		RBC-BF		MN		PMN	
	x 10^6/l		x 10^6/l		x 10^6/l		x 10^6/l	
datum	XT-4000i	Fuchs-Rosenthalova komůrka	XT-4000i	Fuchs-Rosenthalova komůrka	XT-4000i	Fuchs-Rosenthalova komůrka	XT-4000i	Fuchs-Rosenthalova komůrka
17.6.2013	15	14	0	11	12	11	3	3
18.6.2013	1019	986	0	8	118	148	901	838
18.7.2013	559	593	0	0	76	72	483	521
23.7.2013	1715	2031	0	7	213	200	1502	1831
2.8.2013	39050	34400	3000	2400	4476	4600	34574	29800
29.8.2013	28	22	0	1	24	20	4	2
16.9.2013	560	573	0	23	148	133	412	440
17.9.2013	154	152	0	11	67	62	87	90

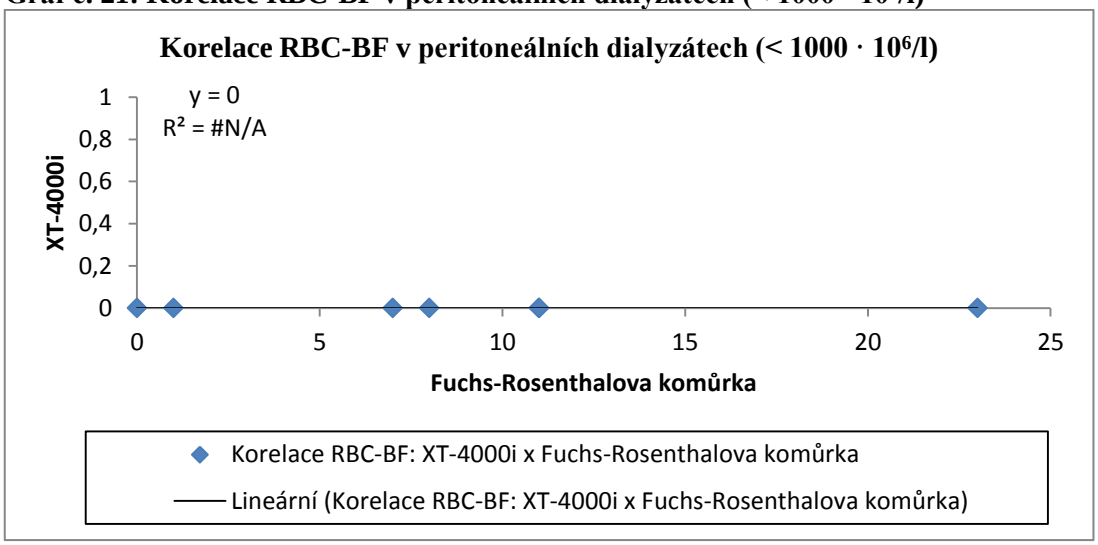
Graf č. 19: Korelace WBC-BF v peritoneálních dialyzátech (< 1000 · 10^6/l)



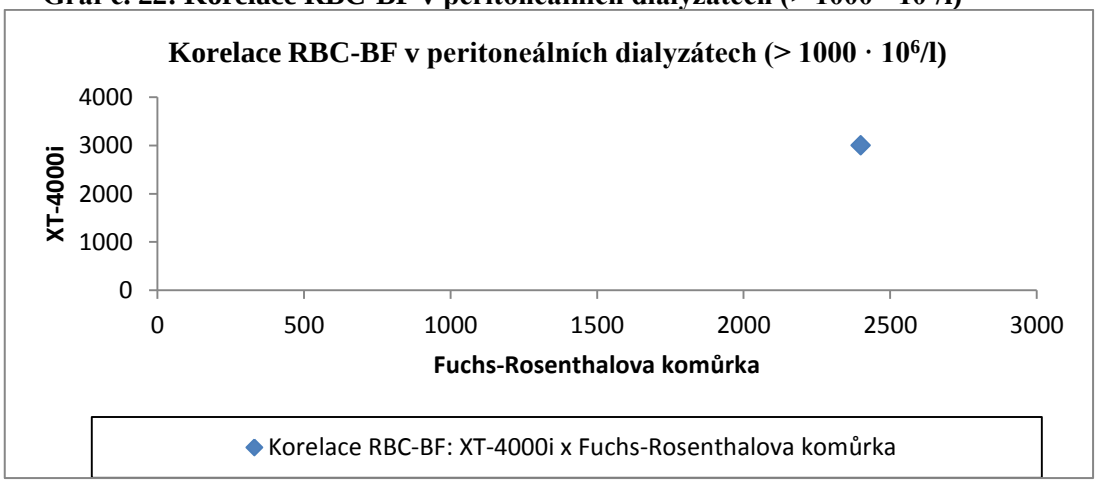
Graf č. 20: Korelace WBC-BF v peritoneálních dialyzátech (> 1000 · 10^6/l)



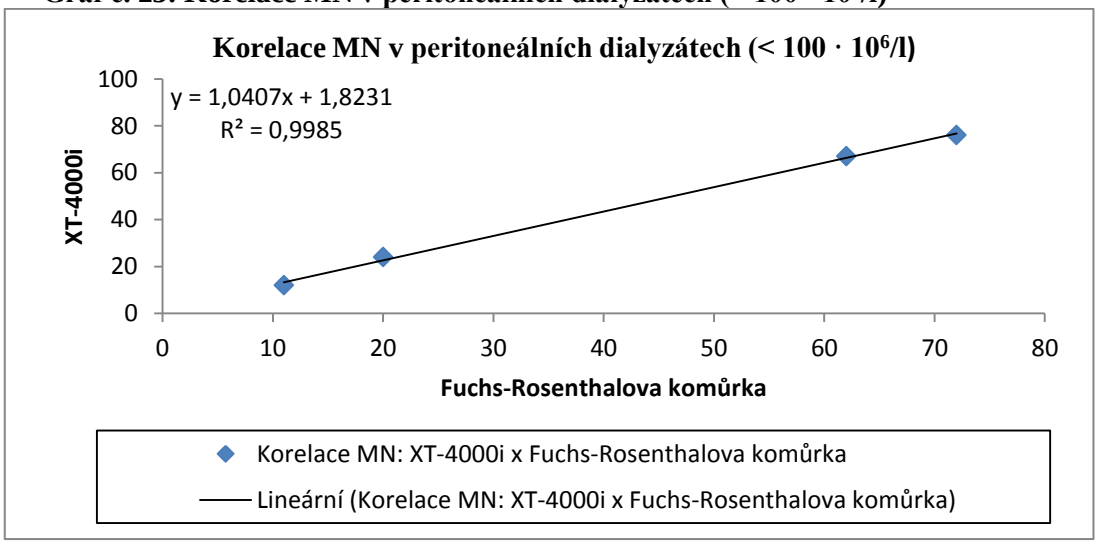
Graf č. 21: Korelace RBC-BF v peritoneálních dialyzátech (< 1000 · 10^6/l)



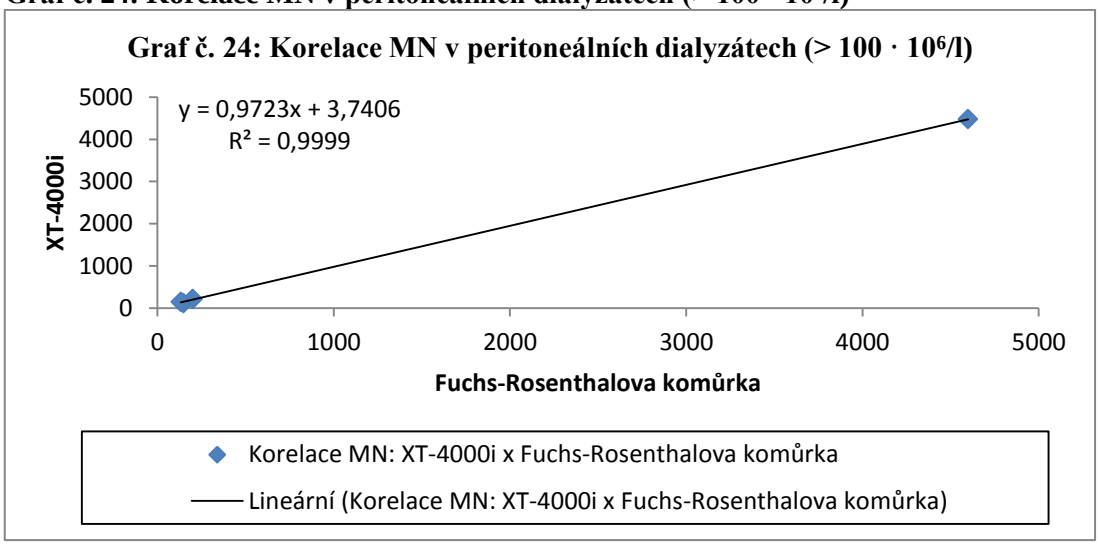
Graf č. 22: Korelace RBC-BF v peritoneálních dialyzátech (> 1000 · 10^6/l)



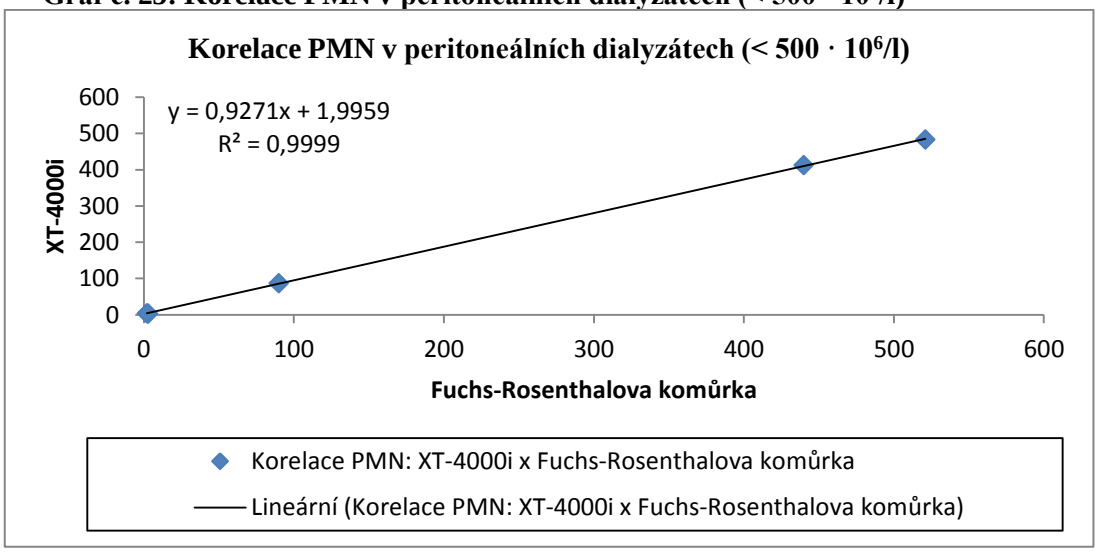
Graf č. 23: Korelace MN v peritoneálních dialyzátech (< 100 · 10^6/l)



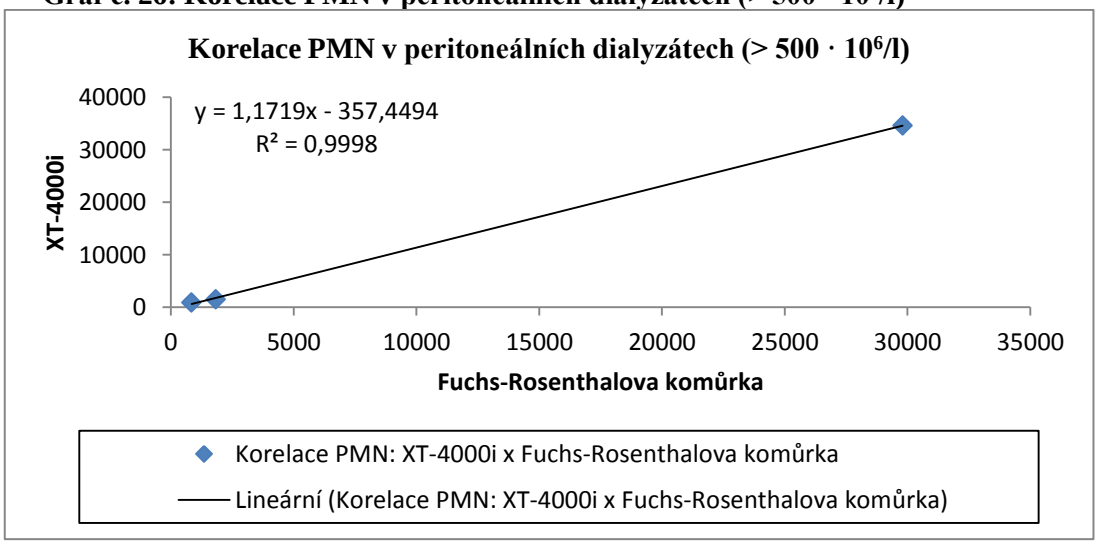
Graf č. 24: Korelace MN v peritoneálních dialyzátech (> 100 · 10^6/l)



Graf č. 25: Korelace PMN v peritoneálních dialyzátech (< 500 · 10^6/l)



Graf č. 26: Korelace PMN v peritoneálních dialyzátech (> 500 · 10^6/l)



Tab. 14: Statistické hodnocení CSF

CSF	počet buněk (10^6/l)	R^2 (graf)	R^2 (manuál)	stupeň volnosti	t-test	t krit
WBC-BF	< 100	0,9338	≥ 0,9000	20	-1,862	2,086
	> 100	0,9840	≥ 0,9000	4	1,461	2,776
RBC-BF	< 1000	nelze	≥ 0,8000	22	1,849	2,074
	> 1000	0,9822	≥ 0,8000	2	-2,826	4,303
MN	< 100	0,9566	≥ 0,9000	21	1,496	2,080
	> 100	0,9910	≥ 0,9000	3	1,350	3,182
PMN	< 10	0,8546	≥ 0,9000	19	1,322	2,093
	> 10	0,9801	≥ 0,9000	5	1,142	2,571

Tab. 15: Statistické hodnocení serózních výpotků

Serózní výpotky	počet buněk (10^6/l)	R^2 (graf)	R^2 (manuál)	stupeň volnosti	t-test	t krit
WBC-BF	< 1000	0,9802	≥ 0,9000	8	1,780	2,306
	> 1000	0,9759	≥ 0,9000	8	1,622	2,306
RBC-BF	< 3000	0,9456	≥ 0,8000	7	1,842	2,365
	> 3000	0,4847	≥ 0,8000	9	0,310	2,262
MN	< 1000	0,9794	≥ 0,9000	10	2,592	2,228
	> 1000	0,7692	≥ 0,9000	6	0,657	2,447
PMN	< 1000	0,8184	≥ 0,9000	14	0,446	2,145
	> 1000	0,9798	≥ 0,9000	2	-2,709	4,303

Tab. 16: Statistické hodnocení peritoneálních dialyzátů

Peritoneální dialyzát	počet buněk (10^6/l)	R^2 (graf)	R^2 (manuál)	stupeň volnosti	t-test	t krit
WBC-BF	< 1000	0,9992	≥ 0,9000	4	1,036	2,776
	> 1000	0,9999	≥ 0,9000	2	0,910	4,303
RBC-BF	< 3000	nelze	≥ 0,8000	6	3,004	2,447
	> 3000	nelze	≥ 0,8000	nelze - oblast musí obsahovat alespoň 2 body		
MN	< 1000	0,9985	≥ 0,9000	3	4,041	3,182
	> 1000	0,9999	≥ 0,9000	3	0,968	3,182
PMN	< 1000	0,9999	≥ 0,9000	4	1,635	2,776
	> 1000	0,9998	≥ 0,9000	2	0,916	4,303

6. DISKUSE

6.1. Kontrola kvality

Po celou dobu měření kontrolního materiálu Cell-Chex Auto L1 a L2 byly zjištěny hodnoty WBC-BF, RBC-BF, MN i PMN, které jsou v mezích udávaných výrobcem. Statistickým hodnocením dat, které byly získány měřením tohoto kontrolního materiálu na analyzátoru XT-4000i bylo prokázáno, že analyzátor poskytuje validní hodnoty. Hodnoty variačního koeficientu preciznosti za podmínek opakovatelnosti a reprodukovatelnosti byly v požadovaných mezích, které uvádí výrobce. Hodnota variačního koeficientu pro MN a PMN nebyla výrobcem uvedena. Pravdivost je v mezích, které jsou na OKH stanoveny v rámci interní kontroly kvality [9].

Jak uvádí výrobce, pro analýzu tělních tekutin není potřeba jakýkoli další kontrolní materiál. Všechny parametry jsou kontrolovány pomocí kontrolní krve SYSMEX e-CHECK (XE), která je dodávána ve třech hladinách. Použitím této kontrolní krve je souběžně monitorována analýza v režimu tělních tekutin i v režimu plné krve [74].

6.2. Linearita měření

Grafickým zpracováním naměřených a vypočtených hodnot WBC-BF bylo prokázáno, že měření probíhalo lineárně. Tato skutečnost byla také potvrzena výrobcem analyzátoru, který uvádí, že měření WBC-BF je lineární do $10\,000 \cdot 10^6$/l [9].

6.3. Stabilita BF

Tímto experimentem bylo prokázáno, že peritoneální dialyzát vykazuje větší stabilitu skladováním při chladničkové teplotě. Zároveň bylo potvrzeno, že buňky v krátké době po odběru skutečně podléhají morfologickým a poté destruktivním změnám a že v případě, pokud nelze vzorek vyšetřit hned po odběru, měl by být uchován v chladničce [25, 28].

6.4. Korelace výsledků analýzy BF

Statistickým hodnocením výsledků vyšetření CSF, které byly naměřeny na analyzátoru XT – 4000i a zjištěny ve Fuchs-Rosenthalově počítací komůrce, bylo zjištěno, že se významně neliší. Díky párovému t-testu bylo ověřeno, že i RBC-BF v méně buněčných vzorcích CSF nevykazují významné rozdíly, což se regresní analýzou nepodařilo prokázat. Obdobně párový t-test objasnil, že se významně neliší výsledky PMN v méně buněčných vzorcích CSF. Z hlediska početnosti každé hodnocené skupiny bylo patrné, že v parametru RBC-BF ve více buněčných vzorcích CSF bylo málo dat a statistické hodnocení tím mohlo být ovlivněno.

Ve vzorcích serózních výpotků statisticky nejlépe dopadly WBC-BF, které se významně nelišily v obou hodnocených skupinách. Regresní analýzou i párovým t-testem dobře vyšly i RBC-BF v méně buněčných vzorcích serózních výpotků. Ve více buněčných vzorcích bylo zjištěno, že je korelace mezi výsledky slabá. Důvodem může být obtížné manuální počítání RBC-BF. Analýzou těchto vysoce buněčných vzorků BF na analyzátoru XT-4000i je výsledek získán za kratší dobu a díky principům detekce má vyšší přesnost měření.

Výsledky statistického hodnocení MN v serózních výpotcích nejsou jednotné. V méně buněčných vzorcích je silná korelace, ale párový t-test dokazuje významný rozdíl mezi výsledky. Ve více buněčných vzorcích je tomu přesně naopak. Podobné hodnocení mají i PMN v méně buněčných vzorcích serózních výpotků. Důvodem může být obtížné mikroskopické odlišení morfologie těchto dvou buněčných populací. Zároveň bylo počítání ve Fuchs-Rosenthalově komůrce zatíženo subjektivní chybou, neboť přidáním barvicích roztoků, jako například 0,2 % roztoku krystalové violeti, sice dojde k lepší klasifikaci WBC-BF, ale příležitostně lze najít RBC-BF, které absorbují barviva, zvláště pokud u nich začal proces lýzy [73].

Ve vzorcích peritoneálních dialyzátů bylo zjištěno, že je silná korelace ve všech hodnocených skupinách (kromě RBC-BF). Párovým t-testem bylo ale odhaleno, že RBC-BF a MN v méně i více buněčných vzorcích vykazují významné rozdíly. Jak je ovšem ze statistického hodnocení patrné, vzorky peritoneálních dialyzátů byly v daném období vyšetřovány nejméně. Statistické hodnocení tudíž není objektivní a je zapotřebí početnější soubor vyšetření peritoneálních dialyzátů.

7. ZÁVĚR

Tato rigorózní práce je zaměřena na cytologické vyšetření tělních tekutin, které jsou analyzovány v hematologické laboratoři OKH v Pardubické krajské nemocnici, a.s. Jedná se o mozkomíšní mok, pleurální, perikardiální a abdominální tekutinu, peritoneální dialyzát a synoviální tekutinu.

Po prostudování informací o výše uvedených tělních tekutinách jsem došla k závěru, že se v literatuře liší údaje, které se týkají cytologického vyšetření. Autoři se v textech také značně liší v uvádění fyziologických mezí pro cytologické vyšetření jednotlivých tělních tekutin. Proto by bylo dobré těmto aspektům věnovat větší pozornost a pokusit se sjednotit informace, které by umožnily větší přehlednost v cytologickém vyšetření tělních tekutin.

Prvním cílem experimentální části této rigorózní práce bylo zaměřit se na kontrolu kvality na analyzátoru XT – 4000i. Z naměřených dat kontrolního materiálu Cell - Chex Auto bylo třeba zjistit preciznost za podmínek opakovatelnosti a reprodukovatelnosti a také pravdivost. Statistickým hodnocením naměřených dat bylo prokázáno, že analyzátor poskytuje validní hodnoty. Z ekonomického hlediska nebylo možné v měření tohoto kontrolního materiálu pokračovat. Výrobce však uvádí, že všechny parametry jsou kontrolovány pomocí kontrolní krve SYSMEX e-CHECK (XE), která je dodávána ve třech hladinách. Použitím této kontrolní krve je souběžně monitorována analýza v režimu tělních tekutin i v režimu plné krve. Kontrola kvality tělních tekutin je tedy v současné době kromě měření a hodnocení kontrolní krve SYSMEX e-CHECK (XE) doplněna o pravidelnou verifikaci [74].

Prokázat linearitu měření na analyzátoru XT – 4000i bylo dalším cílem experimentální části. Ke stanovení byl vybrán vzorek peritoneálního dialyzátu a hodnocena byla linearita WBC-BF. Grafickým zpracováním bylo prokázáno, že měření opravdu probíhalo lineárně. Tato skutečnost byla také potvrzena výrobcem analyzátoru, který uvádí, že měření WBC-BF je lineární do 10 000 $\cdot 10^6$/l [9].

Dalším cílem bylo ověřit stabilitu peritoneálního dialyzátu při laboratorní (21,7 °C) a chladničkové teplotě (6,9 °C). Podařilo se prokázat, že větší stabilitu vykazuje vzorek, který byl skladován při chladničkové teplotě. Tímto experimentem bylo ověřeno s teoretickými poznatky, že buňky v krátké době po odběru skutečně podléhají

morfologickým a poté destruktivním změnám a že v případě, pokud nelze vzorek vyšetřit hned po odběru, měl by být uchován v chladničce [25, 28].

Posledním cílem bylo experimentálně zjistit korelaci výsledků analýzy tělních tekutin zjištěných automatickým analyzátorem XT – 4000i a mikroskopickou metodou za použití Fuchs - Rosenthalovy počítací komůrky. Statistickým hodnocením výsledků vyšetření tělních tekutin bylo patrné, že nejlépe spolu korelují výsledky vyšetření CSF, které se v laboratoři OKH vyšetřují nejčastěji. Zároveň je patrné, že je korelace slabá ve vysoce buněčných vzorcích serózních výpotků (RBC-BF a MN). Důvodem může být obtížné manuální počítání. Analýzou těchto vysoce buněčných vzorků BF v analyzátoru XT-4000i je výsledek získán za kratší dobu a díky principům detekce má vyšší přesnost měření. Dalším důvodem slabé korelace může být obtížné mikroskopické odlišení morfologie buněčných populací, jak dokazuje slabá korelace PMN v méně buněčných vzorcích výpotků, protože počítání ve Fuchs-Rosenthalově komůrce je zatíženo subjektivní chybou. Přidáním barvicích roztoků, jako například 0,2 % roztoku krystalové violeti, sice dojde k lepší klasifikaci WBC-BF, ale příležitostně lze najít RBC-BF, které absorbují barviva, zvláště pokud u nich začal proces lýzy [73].

Ve vzorcích peritoneálních dialyzátů byla zjištěna silná korelace ve všech hodnocených skupinách (kromě RBC-BF). Párovým t-testem bylo ale odhaleno, že RBC-BF a MN v méně i více buněčných vzorcích vykazují významné rozdíly. Jak je ovšem ze statistického hodnocení patrné, vzorky peritoneálních dialyzátů byly v daném období vyšetřovány nejméně. Statistické hodnocení tudíž není objektivní a je zapotřebí početnější soubor vyšetření peritoneálních dialyzátů.

V této rigorózní práci byly splněny všechny cíle. Vyšetření tělních tekutin pomocí automatického analyzátoru XT – 4000i se řadí k novým metodám analýzy tělních tekutin. Proto je třeba zabývat se touto problematikou i nadále, sledovat nové trendy a pokusit se sjednotit informace, které by umožnily větší přehlednost v cytologickém vyšetření tělních tekutin.

8. LITERATURA

1. **Racek J. et al.:** *Klinická biochemie.* Galén, Praha, 2006; str. 91, 269 - 280; ISBN 80-7262-324-9

2. **Součková J.:** *Laboratorní příručka Oddělení klinické hematologie Pardubické krajské nemocnice, a.s.* [Online] citace: 22. 11. 2013; <http://www.nemocnice-pardubice.cz/blob.php/OS_8_12_PKN_51_2+Lab-priruckaka-OKH.pdf?stranky_soubory=174>

3. **Nguyen K.G. et al.:** *Essentials of fluid cytology.* [Online] citace: 13. 9. 2013; <http://pathology.ubc.ca/files/2012/06/FLUIDCYTOLOGYBook09R1.pdf.>

4. **Fiala P., Musil J. et al.:** *Onemocnění pleurálního prostoru.* Galén, Praha, 2009; str. 7 – 36; ISBN: 978-80-7262-551-2

5. **Baer K.E., Smith G.P.:** *Serous body cavity fluid examination.* Lab. Med., 2011, 32 (2), str. 85-87

6. **Aceves-Avila F.J. et al.:** *The first descriptions of therapeutic arthrocentesis: A historical note.* Rheumatology, 2003, 42 (1), str. 180 – 183

7. **Crestwood medical center:** *Body fluids.* [Online] citace: 13. 9. 2013; <http://www.crestwoodmedcenter.com/Services/Pages/Body%20Fluids.aspx>

8. **Lehto T.M. et al.:** *Evaluation of the Sysmex XT-4000i for the automated body fluid analysis.* [Online] citace: 4. 12. 2013; <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijlh.12134/abstract>

9. **Sysmex:** *Automatický hematologický analyzátor XT-4000i; Návod k použití.* Sysmex Corporation, Kobe, 2009; str. 1-1 – 13-3; BQ190433CS.

10. **Sysmex:** *Sysmex XT-4000i Automated Hematology Analyzer.* [Online] citace: 9. 12. 2013; <https://www.sysmex.com/US/en/Products/Hematology/XTSeries/Pages/XT-4000-Hematology-Analyzer.aspx>

11. **Tycová B.:** *Výsledek vyšetření periferní krve na analyzátoru XT-4000i.* Oddělení klinické hematologie, Pardubická krajská nemocnice, a.s.; 27. 11. 2013.

12. **Tycová B.:** *Výsledek vyšetření BF na analyzátoru XT-4000i.* Oddělení klinické hematologie, Pardubická krajská nemocnice, a.s.; 18. 6. 2013

13. **Sysmex:** *Introduction to Sysmex technology.* [Online] citace: 9. 12. 2013. <http://www.sysmex.co.jp/en/ir/data_irreport/annual/pdf/2009/sysmexAR2009_11.pdf>

14. **Katakami T. et al.:** *XE-5000/XT-4000i; Clinical case report; Body fluid mode.* Sysmex Corporation, Kobe, 2010; 1. vydání; str. 4 – 66

15. **Fujimoto K.:** *Principles of measurement in hematology analyzers manufactured by Sysmex Corporation.* Sysmex J Int, 1999, 9 (1), str. 31 - 44

16. **Sysmex:** *DC sheath flow detection method.* [Online] citace: 9. 12. 2013; <http://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/dc-sheath-flow-detection-method.html>

17. **Sysmex:** *Sheath flow DC detection method.* [Online] citace: 10. 12. 2013; <http://www.sysmex.co.jp/en/r_and_d/development/pop_eseries.html>

18. **Kottle-Marchant K., Davis B.H.:** *Laboratory Hematology Practice.* Wiley-Blackwell, 2012; str. 27; ISBN 978-1-4051-6218-0

19. **Rahman M.:** *Introduction to Flow Cytometry.* [Online] citace: 10. 12. 2013; < http://www.abdserotec.com/introduction-to-flow-cytometry.html >

20. **Sysmex:** *Flow cytometry method.* [Online] citace: 10. 12. 2013; <http://www.sysmex.co.jp/en/r_and_d/development/pop_xeseries.html>

21. **Sysmex:** *Flourescence flow cytometry.* [Online] citace: 10. 12. 2013; <http://sysmex.co.uk.sitegeist.de/training/knowledge-centre/measurement-technologies/fluorescence-flow-cytometry.html>

22. **Crocker J., Burnett, D.:** *The science of laboratory diagnosis.* Wiley, 2005; 2. vydání; str. 267; ISBN: 0470859121.

23. **Sysmex:** *Examples of body fluid analysis.* [Online] citace: 11. 12. 2013; <http://www.sysmex.ru/files/articles/Xtra_online_XE-5000_bodyfluids.pdf>

24. **Zima T. et al.:** *Laboratorní diagnostika.* Galén, 2007, Praha; 2. vydání; str. 417 – 447; ISBN 978-7262-372-3

25. **Kala M., Mareš J.:** *Lumbální punkce a mozkomíšní mok.* Galén, 2008, Praha; 1. vydání; str. 13 – 60; ISBN 978-80-7262-568-0

26. **Ambler Z.:** *Základy neurologie; Učebnice pro lékařské fakulty.* Galén, 2006, Praha; 6. vydání; str. 97 – 99; ISBN 80-7262-433-4

27. **Riverside hospital:** *Lumbar puncture (spinal tap).* [Online] citace: 12. 12. 2013; <http://www.riversideonline.com/health_reference/Test-Procedure/MY00982.cfm>

28. **Cibas E.S.:** *Cerebrospinal fluid.* [Online] citace: 24. 7. 2013; <http://www.us.elsevierhealth.com/media/us/samplechapters/9781416053293/Chapter%2006.pdf>

29. **McManus J.C., Hausman K.A.:** *Cerebrospinal fluid analysis.* Nursing, 1982, 12; str. 43-47

30. **Teřl M., Pešek M., Tauchman, A.:** *Pleurální výpotek v interní praxi.* Vnitř Lék, 2005, 51 (4); str. 430 – 437

31. **Fila L.:** *Pleurální výpotky.* Interní Med., 2007, 9 (11); str. 490 – 494

32. **Marel M., Fila K.:** *Novinky v péči o nemocné s pleurálními výpotky.* Postgrad Med, 2011, 6; str. 656

33. **Schumpelick V. et al.:** *Atlas of General Surgery.* Georg Thieme Verlag, 2009; 2. vydání; str. 31; ISBN 978-3-13-144091-4

34. **Jakubec P. et al.:** *Úvod do laboratorní diagnostiky pleurálního výpotku.* Vnitř Lék, 2008, 54 (3); str. 265 – 272

35. **Braunwald E.:** *Pericardial disease.* [Online] citace: 19. 5. 2013. <http://www.mhprofessional.com/downloads/products/0071702911/loscalzo_cardiovascular_ch22_p254-264.pdf>

36. **Čihák R., DrugaR., Grim M.:** *Anatomie 3.* Grada Publishing, a. s., 2004; 2. vydání; str. 50-53; ISBN: 978-80-247-1132-4

37. **Thelen M. et al.:** *Cardiac imaging: multimodality approach.* Georg Thieme Verlag, 2009; 1. vydání; str. 25. ISBN: 978-3-13-147781-1

38. **Iaizzo P.A.et al.:** *Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices.* New York: Springer Science & Business Media, 2009; 2. vydání; str. 125 – 132; ISBN 978-1-60327-371-8

39. **Yeung S. - Ch.J., Escalante C.P., Gagel, R.F.:** *Medical care of cancer patients.* BC Decker, 2009; str. 494; ISBN: 978-1-60795-008-0

40. **Sutton G., Chatterjee K.:** *Nemoci perikardu.* Kardiol Rev, 2003, 3; str. 138 - 145

41. **Riedel M.:** *Perikardiální výpotek.* Kardiol Rev, 2003, 2; str. 76 – 80

42. **Gregor P.:** *Perikarditidy.* Postgrad Med, 2000, 2; str. 40 – 41

43. **Hoffmann B.:** *Ultrasound Guided Procedures in Emergency Medicine Practice - Pericardiocentesis.* [Online] citace: 12. 12. 2013; <http://www.sonoguide.com/pericardiocentesis.html>

44. **Jabor A. et al.:** *Vnitřní prostředí.* Grada Publishing, a.s., 2008, Praha; 1. vydání; str. 448; ISBN: 978-80-247-1221-5

45. **Leeuwen A.M. et al.:** *Pericardial fluid analysis.* [Online] citace: 12. 12. 2013; <http://www.labdxtest.com/labdxtest/view/Davis-Lab-and-Diagnostic-Tests/425127/all/Pericardial_Fluid_Analysis#0>

46. **Rush University Medical Center:** *Body Fluids Cell Count and Differential.* [Online] citace: 22. 11. 2013; <http://www.rush.edu/webapps/rml/RMLTestEntryDtl.jsp?id=2669>

47. **Čihák R.:** *Anatomie 2.* Grada Publishing, a.s., 2002; 2. vydání; str. 147 – 158; ISBN: 80-247-0143-X

48. **Patel R., Beal I., Planche, K.:** *Applied Peritoneal Anatomy - A Pictorial review.* [Online] citace: 28. 6. 2013; <http://www.fmri.org.mx/pdf/ESR2_Applied_Peritoneal_Anatomy_A_Pictorial_review.pdf. 10.1594/ecr2011/C-1925>

49. **Noh S. - M.:** *Measurement of peritoneal fluid pH in patients with non-serosal invasive gastric cancer.* Yonsei Med J, 2003, 44 (1), str. 45 – 48

50. **Dunn D.L. et al.:** *The adjuvant effect of peritoneal fluid in experimental peritonitis.* Ann. Surg., 1984, 1; str. 37 – 43

51. **Sláma O., Šimíček M.:** *Možnosti paliativní léčby maligního ascitu.* Postgrad Med, 2012, 10, str. 96

52. **Lata J., Vaňásek T.:** *Ascites; Doporučené postupy pro praktické lékaře.* [Online] citace: 29. 6. 2013; <www.cls.cz/dokumenty2/os/t183.rtf . reg. č.: o/017/183>

53. **Špinar J. et al.:** *Propedeutika a vyšetřovací metody vnitřních nemocí.* Grada Publishing, a.s., 2008, Praha; 1. vydání; str. 102 – 103; ISBN 978-80-247-1749-4

54. **Hloch O.:** *Vyšetření břicha.* [Online] citace: 12. 12. 2013. <http://www.propedeutika.cz/vys_bricha.html#ascites>

55. **Zuber T.J., Mayeaux M.D.:** *Atlas of primary care procedures.* Lippincott Williams a Wilkins, 2004, Philadelphia; str. 44 – 47; ISBN: 978-0-7817-3905-4

56. **Shlamovitz G. Z. et al.:** *Paracentesis.* [Online] citace: 12. 12. 2013; <http://emedicine.medscape.com/article/80944-overview#a10>

57. **Hawkey C.J. et al.:** *Textbook of Clinical Gastroenterology and Hepatology.* Blackwell Publishing, 2012; 2. vydání; str. 104 – 106; ISBN 978-1-4051-9182-1

58. **Tesař V., Schück O. et al.:** *Klinická nefrologie.* Grada Publishing, a.s., 2006, Praha; str. 561 – 578; ISBN:80-247-0503-6

59. **Baxter Healthcare Corporation:** *Dineal PD - 2 peritoneal dialysis solution.* [Online] citace: 8. 8. 2013; <http://www.baxter.com/downloads/patients_and_caregivers/products/dianeal_ambulexpd2.pdf. 07-19-59-178>

60. **Řehořová J., Štěpánková S., Ševčík, J.:** *Spolupráce praktického lékaře se specialistou v péči o nemocné na dialýze.* Med praxi, 2010, 7 (6); str. 263 - 267

61. **Morning Sniffles:** *Peritoneal dialysis versus hemodialysis.* [Online] citace: 12. 12. 2013.] <http://www.morningsniffles.com/wp-content/uploads/2011/11/PD.jpg>

62. **Li P.K.T. et al.:** *Peritoneal dialysis - related infections recommendations:* 2010 update. Perit Dial Int, 2010, 30 (4); str. 393 – 423

63. **Marieb E.N., Mallatt J.:** *Anatomie lidského těla.* CP Book, 2005, Brno; překlad: Jurečka T. et al.; str. 212 – 220; ISBN 80-251-0066-9

64. **Mundt L.A, Shanahan K.:** *Graff´s textbook of routine urinalysis and body fluids.* Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer business, 2011, Philadelphia; 2. vydání; str. 254 – 262; ISBN: 978-1-58255-875-2

65. **Smith M.D.:** *The Normal Synovium.* Open Rheumatol J, 2011, 5; str. 100 – 106

66. **Stuart L. et al.:** *Turek´s orthopaedics: principles and their application.* Lippincott Williams & Wilkins, 2005, Philadelphia; 6. vydání; str. 152 – 153; ISBN: 0-7817-4298-6

67. **Dylevský I.:** *Obecná kineziologie.* Grada Publishing, a.s., 2007, Praha; str. 142 - 144; ISBN: 978-80-247-1649-7

68. **Turgeon M.L.:** *Clinical Hematology: Theory and Procedures.* Lippincott Williams & Wilkins, 2005, Philadelphia; 4. vydání; str. 425; ISBN 0-7817-5007-5

69. **Reichman E.F., Waddell R.:** *Arthrocentesis.* [Online] citace: 31. 8. 2013 <http://www.uth.tmc.edu/schools/med/imed/residency/chiefscorner/Documents/procedures/Arthrocentesis.pdf>

70. **Denton J.:** *Synovial fluid analysis in the diagnosis of joint disease.* Diagn Histopathol, 2012, 18 (4); str. 159 – 168

71. **Moskowitz R.W. et al.:** *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/surgical Management.* Lippincott Williams & Wilkins, 2007, Philadelphia; 4. vydání; str. 204 – 205; ISBN: 978-0-7817-6707-1

72. **Clinical and Laboratory Standards Institute:** *Body fluid analysis for cellular composition. Proposed guideline.* [Online] citace: 14. 10. 2013 <http://isoforlab.com/phocadownload/csli/H56-P.pdf. H56P>

73. **Sysmex:** *Mozkomíšní mok (CSF): materiál se zvláštními požadavky.* [Online] citace: 10. 9. 2013; <http://www.sysmex.cz/files/f15/Image/pic_9584/STE_mozkomisni_mok_A4_3.pdf>

74. **Sysmex:** *XE-5000. Anylýza tělních tekutin.* [Online] citace: 12. 10. 2013; <http://www.sysmex.cz/files/f15/Image/pic_9584/XE_5000.pdf>

Seznam obrázků:

Obr. 1: Automatický hematologický analyzátor XT – 4000i [10] 12
Obr. 2: Výsledek vyšetření periferní krve [11] 13
Obr. 3: Výsledek vyšetření BF [12] 13
Obr. 4: Schéma hydrodynamické fokusace [17] 14
Obr. 5: Impedanční princip [18] 14
Obr. 6: Fluorescenční průtoková cytometrie s použitím polovodičového laseru [22] 15
Obr. 7: Provedení lumbální punkce [27] 18
Obr. 8: Provedení thorakocentézy [33] 22
Obr. 9: Provedení perkutánní perikardiocentézy [43] 26
Obr. 10: Místa pro provedení abdominální paracentézy [56] 28
Obr. 11: Provedení peritoneální dialýzy [61] 31
Obr. 12: Provedení arthrocentézy kolenního kloubu [64] 34

Seznam tabulek:

Tab. 1: Vzhled CSF [1] 19
Tab. 2: Počet elementů v CSF [24] 20
Tab. 3: Rozdělení pleurálních výpotků z cytologického hlediska [31] 23
Tab. 4: Klasifikace synoviální tekutiny [64] 35
Tab. 5: Reagencie pro hematologický analyzátor XT – 4000i 39
Tab. 6: Preciznost za podmínek opakovatelnosti 41
Tab. 7: Preciznost za podmínek reprodukovatelnosti 41
Tab. 8: Pravdivost 41
Tab. 9: Linearita WBC-BF 42
Tab. 10: WBC-BF v peritoneálním dialyzátu 42
Tab. 11: Korelace analýzy CSF 43
Tab. 12: Korelace analýzy serózních výpotků 48
Tab. 13: Korelace analýzy peritoneálních dialyzátů 52
Tab. 14: Statistické hodnocení CSF 55
Tab. 15: Statistické hodnocení serózních výpotků 55
Tab. 16: Statistické hodnocení peritoneálních dialyzátů 55