

Astma u koní – tipy a triky pre spoľahlivú cytologickú diagnostiku



Zdroj: Dr. Maria Christian

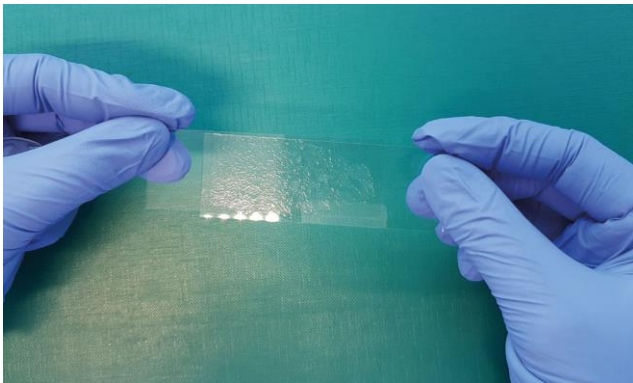
Diagnostika respiračných ochorení u koní sa zakladá na jednej strane na anamnéze, klinickom vyšetrení, endoskopickom náleze a funkčných testoch pľúc, na druhej strane sú však dôležitými zložkami diagnostického procesu laboratórne vyšetrenia ako cytológia vzoriek z dýchacích ciest (TBS – tracheobronchiálny sekret, BAL – bronchoalveolárna laváž). Ako vždy, výpovedná hodnota laboratórných vyšetrení stojí a padá na výbere správneho materiálu vzorky a jej optimálnom spracovaní.

Vyšetrenie TBS a/alebo BAL je indikované pri klasických príznakoch ochorení dýchacieho systému, ako sú kašeľ, patologické zvuky pri dýchaní, výtok z nosa a dyspnoe. K indikáciám však patrí aj intolerancia záťaže, pretože zvlášť u slabej až miernej astmy koní (predtým zvanej Inflammatory Airway Disease (IAD) môžu byť klinické príznaky pomerne nenápadné.

Odber TBS a BAL je v literatúre veľmi dobre popísaný, s praktickými radami a tipmi (napr. Schwarz & Kühn). Ale predsa, kedy vyšetřovať TBS a kedy je lepšie získať BAL? Aká je výpovedná hodnota nálezov z rôznych materiálov vzorky? Na bakteriologické vyšetřenie sa uprednostňuje materiál z trachey, takže pri podozrení na bakteriálne ochorenia (napr. pri horúčke) je v každom prípade potrebný odber TBS. Pri podozrení na bakteriálnu pneumóniu je robenie BAL priam kontraindikované. Na cytologické vyšetřenie je však výrazne vhodnejšia vzorka BAL, pretože tieto nálezy na rozdiel od nálezov z TBS dobre korelujú s patohistológiou. Cytologický obraz TBS nie je reprezentatívny pre nižšie dýchacie cesty. Pri cytologickej diagnostike difúzných ochorení pľúc je preto metódou voľby BAL. V ideálnom prípade odoberáme oba typy vzoriek. Správne spracovanie vzoriek je pre úspešnú diagnostiku rovnako dôležité ako ich

odborný odber. Nanešťastie bunky v tekutinách výplachov veľmi rýchlo degenerujú. Preto je potrebné, aj v prípade zasielania vzoriek do laboratória, spraviť cytologické preparáty ihneď z čerstvého materiálu. Pokiaľ sa nátery robia až v laboratóriu, sú bunky už po niekoľkých hodinách transportu/skladovania nehodnotiteľné a výpovedná hodnota cytologických nálezov rapidne klesá.

Pokiaľ je možné získať **TBS bez výplachu**, robíme odtlačkové preparáty rovno z hlienu. Jedna kvapku materiálu nanesieme na podložné sklíčko, druhé podložné sklíčko bez použitia tlaku položíme naň a rýchlo potiahneme cez spodné sklíčko, alebo obidve sklíčka potiahneme smerom od seba, aby sa materiál rozotrel „ako maslo na chlieb“ (obr. 1). Pokiaľ získame TBS výplachom, materiál najprv centrifugujeme pri nízkych otáčkach (200-300 g), tekutinu odlejeme a nakoniec kvapku sedimentovaného hlienu rozotrieme ako je popísané vyššie.



Obr. 1: Rozterový preparát

Zdroj: Laboklin

Tekutina BAL vždy obsahuje málo buniek, takže pre cytologické posúdenie je potrebné zhotoviť preparát z koncentrovanej vzorky. Najjednoduchšou metódou je zhotovenie náterov zo sedimentu. Jednu časť vzorky centrifugujeme podobne ako výplachy trachey pri nízkej rýchlosti otáčania a väčšinu supernatantu odlejeme. Bunky naspodku resuspendujeme v zvyšnej tekutine a rozotrieme technikou krvného náteru. Malá kvapka suspenzie sa umiestni na kraj podložného sklíčka. Druhé sklíčko sa pod uhlom 45° položí pred ňu, cúvame s ním ku kvapke, až sa kvapka rozpíje po celom okraji sklíčka. Nakoniec vzorku rozotrieme plynulým a rovnomerným pohybom sklíčka dopredu. Preparáty najvyššej kvality na hodnotenie tekutín chudobných na bunky sa

vyrábajú cytocentrifugáciou. Pre určité centrifúgy existujú na tento účel špeciálne diely, ich nákup sa však oplatí len pri častejšom využití. Pomocou jednoduchých prostriedkov si však môžeme sami vyrobiť „sedimentačnú komôrku“ (obr. 2).

Dvojmililitrovú striekačku pritlačíme pomocou silných štipcov na podložnom sklíčku na filtračný papier, ktorý má presne pod otvorom striekačky dieru rovnakej veľkosti. Cez kónus striekačky naplníme materiálom. Filtračný papier nasáva pomaly tekutinu a bunky sa koncentrujú v oblasti diery na podložnom sklíčku. Aby sme zabránili in vitro rozmnoženiu baktérií, umiestnime komôrku počas sedimentácie do chladničky.



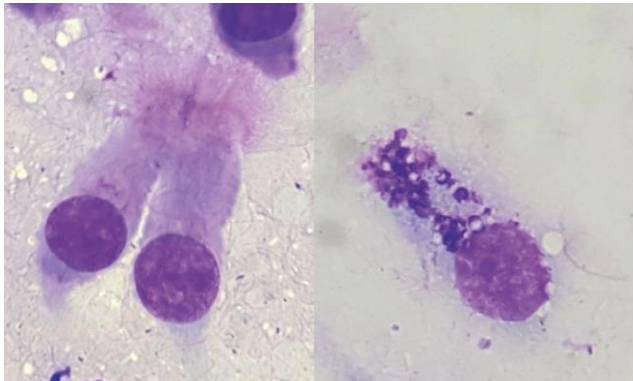
Obr. 2: Sedimentačná komôrka, vyrobená z podložného sklíčka, filtračného papiera s vystrihnutou dierou, striekačky a dvoch silných štipcov

Zdroj: Laboklin

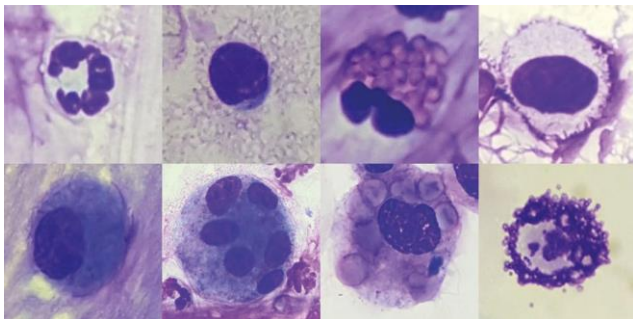
Pre **zachovanie buniek** je dôležité preparáty čo najrýchlejšie vysušiť. Najmä v prípade viskózneho materiálu je možné proces sušenia urýchliť umiestnením preparátov do inkubátora alebo na teplý povrch. Možné je aj opatrné fénovanie vlažným vzduchom. Do laboratória sa **zasielajú** suché nenafarbené podložné sklíčka zabalené v prepravných boxoch. Pridáme reprezentatívne vzorky v poriadne uzavretých skúmavkách bez činidiel. Tekutý materiál je potrebné poslať do laboratória čo najskôr a schladený (prípadne aj s chladiacou vložkou). Preparáty je možné zafarbiť komerčne dostupnými farbivami typu Romanowsky. Aspoň jeden preparát sa však farbí roztokom, ktorý farbí špeciálne granuly mastocytov, napríklad toluidínová modrá. Vo vzorkách z dýchacích ciest sú tieto granuly veľmi ľahko prehliadnuteľné, hoci sú diagnosticky veľmi dôležité (obr. 4).

Fyziologický obraz buniek TBS a BAL odráža anatomickú štruktúru príslušných častí

dýchacieho systému. U zdravých zvierat sú cytologické preparáty chudobné na bunky, s malým počtom tkanivových buniek (ciliárny epitel a pohárikové bunky, obr. 3) a malým počtom zápalových buniek (hlavne makrofágy a lymfocyty, menej neutrofilov, eozinofilov a žirných buniek, obr. 4). Prehľad bunkového zloženia TBS a BAL u asymptomatických koní je uvedený v tabuľke 1.



Obr. 3: Vľavo – riasinkový epitel, vpravo – poháriková bunka, rýchlofarbenie Romanowsky *Zdroj: Laboklin*

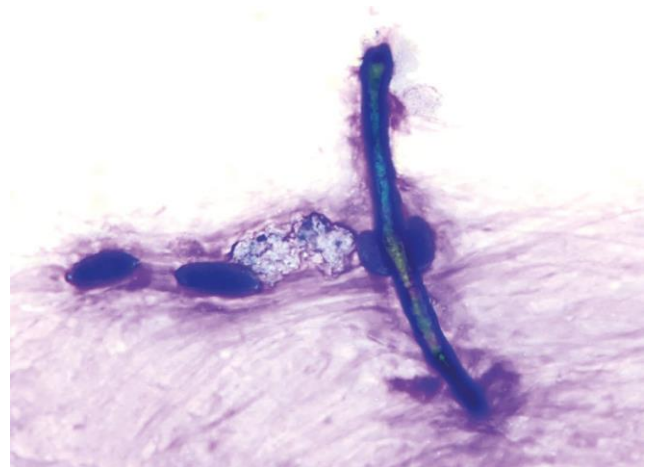


Obr. 4: Zápalové bunky; hore zľava doprava: neutrofil, lymfocyt, eozinofil, mastocyt (rýchlofarbenie Romanowsky); dolu: inaktivovaný makrofág, viacjadrový makrofág, erytrofagocytóza, mastocyt (toluidínová modrá) *Zdroj: Laboklin*

V literatúre nenájdeme takmer žiadne referenčné hodnoty pre bunkové zloženie TBS. Často citované tvrdenie, že > 20 % neutrofilov

naznačuje zápalový proces, by sa malo tiež posudzovať kriticky.

Štúdie ukázali, že za určitých podmienok môžu mať aj klinicky zdravé kone výrazne zvýšený podiel neutrofilných granulocytov v TBS. Medzi diskutované príčiny patrí o. i. kŕmenie sena vo forme okrúhlych balíkov, pobyt vonku v chladnom počasí a intenzívny tréning. Bunkové zloženie BAL je oveľa menej závislé od faktorov prostredia, a preto je vhodnejšie na diagnostiku diseminovaných ochorení, najmä dolných dýchacích ciest. Samozrejme, najlepšiu výpovednú hodnotu získame pri súčasnom posúdení nálezov BAL a TBS.



Obr. 5: Podlhovastá hýfa huby s dvojitou stenou a 4 peľové zrná, rýchlofarbenie Romanowsky *Zdroj: Laboklin*

Pri ochoreniach dýchacích ciest sa mení množstvo buniek a tiež pomery jednotlivých typov buniek. Cytologické vyšetrenie navyše hľadá ďalšie zložky, ako sú vdychnuté hubové štruktúry (obr. 5), časti rastlín a peľ (obr. 5) alebo infekčné agens, ako sú baktérie. Curschmannove špirály (obr. 6) sú odliatky malých dýchacích ciest s hlienom a naznačujú slabý mukociliárny klírens.

Typ buniek	TBS fyziologicky	BAL fyziologicky
Riasinkové epitelie	hojne	ojedinele
Makrofágy	49,6 +/- 8,2 %	50 – 70 %
Lymfocyty	9,3 +/- 5,8 %	30 – 50 %
Neutrofily	9,3 +/- 4,9 %	< 5 %
Eozinofily	0,2 +/- 0,6 %	< 0,1 %
Mastocyty	0 %	< 2 %

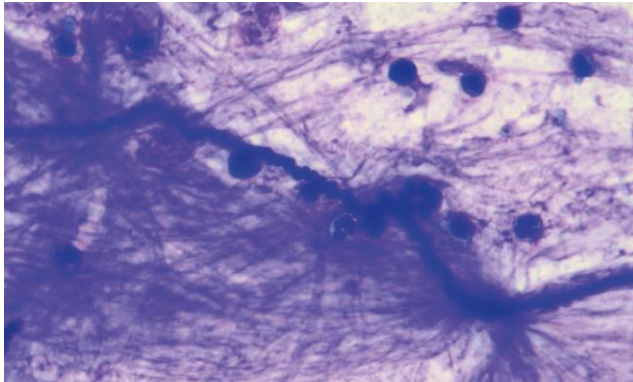
Tab. 1: Fyziologický obsah buniek v TBS a BAL

podľa Cian et al. 2015

Typ buniek v BAL	Mierna/stredná astma koní (AID)	Ťažká astma koní (RAO)
Neutrofily	5 - 20 %	> 25 %
Eozinofily	> 0,1 %	< 0,1 %
Mastocyty	> 2 %	< 2 %

Tab. 2: Obsah buniek v BAL pri astme u koní

podľa Cian et al. 2015

Obr. 6: Curschmannove špirály, rýchlolarbenie Romanowsky
Zdroj: Laboklin

Stanovenie počtu buniek v BAL je obzvlášť užitočné pri rozlišovaní **sterilných zápalov**, ako je mierna až stredne závažná astma koní (predtým: IAD) a ťažká astma koní (predtým: rekurentná obštrukcia dýchacích ciest (RAO)) (tabuľka 2). Obe formy astmy vedú k zvýšenému percentu neutrofilov v materiáli vzorky. Pri miernej až stredne ťažkej astme koní je toto zvýšenie len mierne výrazné (5 – 20 % neutrofilov) a možno nájsť aj viac mastocytov (> 2 %) a eozinofilov (> 0,1 %).

Ťažká astma koní je sprevádzaná významným zvýšením počtu neutrofilných granulocytov (> 25 %) a v mnohých prípadoch takmer výlučne nachádzame neutrofily.

Septické zápaly zvyčajne spôsobujú veľmi vysoký počet buniek s rovnako vysokým podielom neutrofilných granulocytov. Preto sa bunkový obraz pri absencii dôkazu fagocytovaných baktérií môže zdať rovnaký ako pri vysokom stupni sterilného zápalu. Cytologické nálezy je preto dôležité interpretovať vždy v kombinácii s anamnézou a klinickým obrazom. Pri klinickom podozrení na bakteriálne ochorenie je potrebné vždy robiť bakteriologické vyšetrenie z TBS. Makrofágy, ktoré majú fagocytované erytrocyty (obr. 4) alebo obsahujú produkty ich rozpadu (hemosiderín alebo hematidín), naznačujú prítomnosť krvácania v pľúcach. Ľahké krvácanie možno pozorovať v priebehu rôznych ochorení a môže byť spôsobené napr. ťažkými záchvatmi kašľa. Výrazné prímеси krvi však môžu

naznačovať prítomnosť **záťažou vyvolaného pľúcneho krvácania (EIPH)**. Samozrejme treba odlíšiť krvácanie od prímеси krvi súvisiacej s odberom. To zabezpečíme vyšetrením preparátov zhotovených z čerstvo získanej vzorky. Ak sú aj tu známky degradácie erytrocytov, dochádza ku krvácaniu.

Pri niektorých zriedkavých pľúcnych ochoreniach, ako napr. konskej multinodulárnej pľúcnej fibróze (EMPF), je pre diagnózu nevyhnutné patohistologické vyšetrenie pľúcneho tkaniva, keďže cytologický nález BAL nie je špecifický. Z BAL však pomocou PCR môžeme testovať EHV-5, ktorý je asociovaný s EMPF.

Cytológia TBS a BAL je nielen cenným príspevkom k diagnostike respiračných ochorení, ale poskytuje aj informácie o závažnosti ochorenia a možných terapeutických prístupoch. Výber vhodného materiálu vzorky a príprava dobre hodnotiteľných cytologických preparátov sú kľúčové pre nálezy s vysokou výpovednou hodnotou.

Dr. med. vet. Maria Christian

Literatúra

Schwarz B, Kühn H. Durchführung und Probenaufbereitung von Tracheobronchialsekret und Bronchoalveolarlavage in der Pferdepraxis und die häufigsten Fehlerquellen. TU Pferd & Nutztier 2020; 75 (4): 6 – 12

Cian F, Monti P, Durham A. Cytology of the lower respiratory tract in horses: An updated review. Equine Vet Educ 2015; 27 (10): 544 – 553