

Průtoková cytometrie v hematologii: Základní principy a aplikace

VI. Hanácké dny laboratorní medicíny



Průtoková cytometrie

Laboratorní metoda, která umožňuje rychlou multiparametrickou analýzu buněk.

U každé buňky z připravené buněčné suspenze je možné analyzovat:

- velikost buňky,
- vnitřní strukturu buňky (granularita),
- detekovat tzv. CD znaky (intracelulární x extracelulární).

Význam průtokové cytometrie spočívá zejména v tzv. imunofenotypizaci buněk, tj. možnosti detekovat antigeny buněk (CD znaky).

Aplikace průtokové cytometrie

- Hematologie, onkologie, imunologie
 - Imunofenotypizace lymfocytů
 - Funkční testy a testy fagocytózy
 - Měření obsahu DNA v buňkách (hodnocení ploidie, buněčného cyklu)
 - Stanovení cytokinů
- Diagnostika onkologických onemocnění
- Monitorování terapeutické odpovědi

Princip průtokové cytometrie

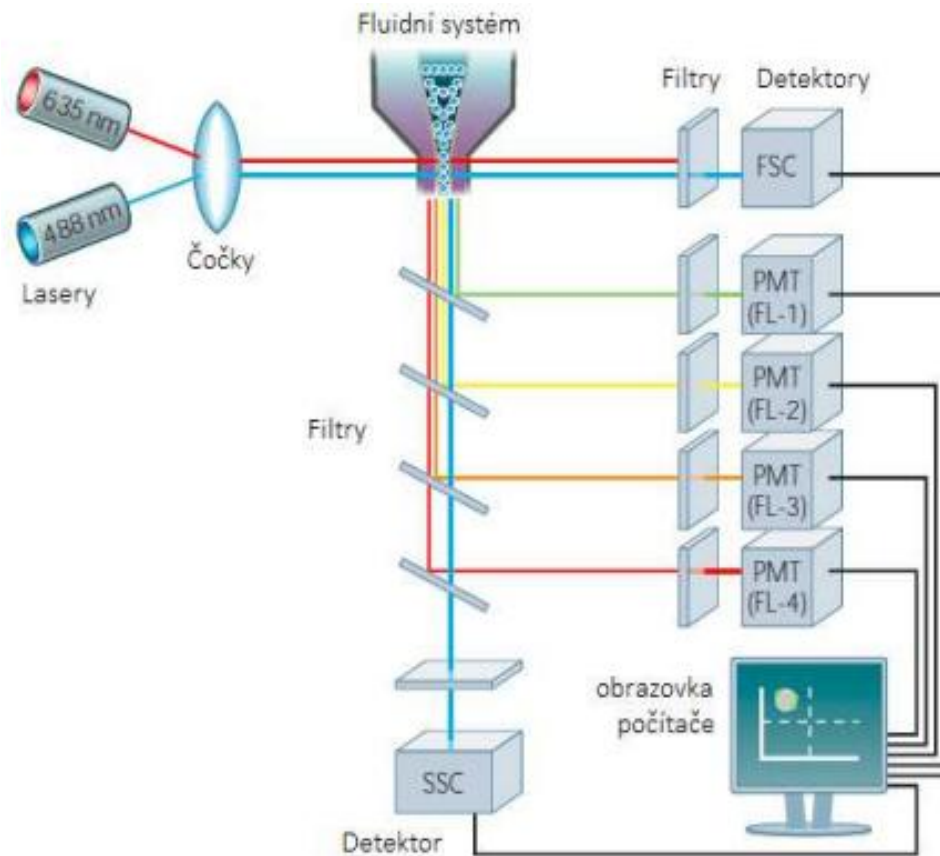
- identifikace a kvantifikace buněk

Buněčná suspenze je unášena proudem nosné kapaliny → s paprskem světla dochází na buňkách k rozptylu světla v různých úhlech → rozlišení vlastností buněk.

- fluorochromem konjugované monoklonální protilátky (možnost kombinace a vizualizace mnoha znaků najednou)

Průtokový cytometr

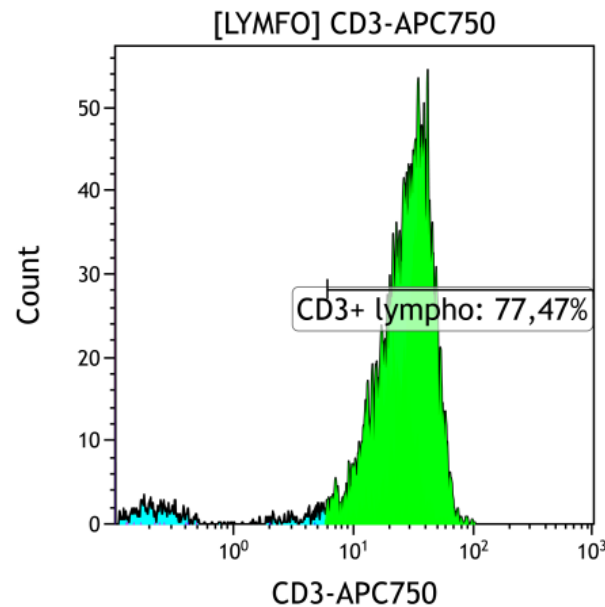
Průtokový cytometr tvoří 3 základní systémy: fluidní, optický a elektronický.



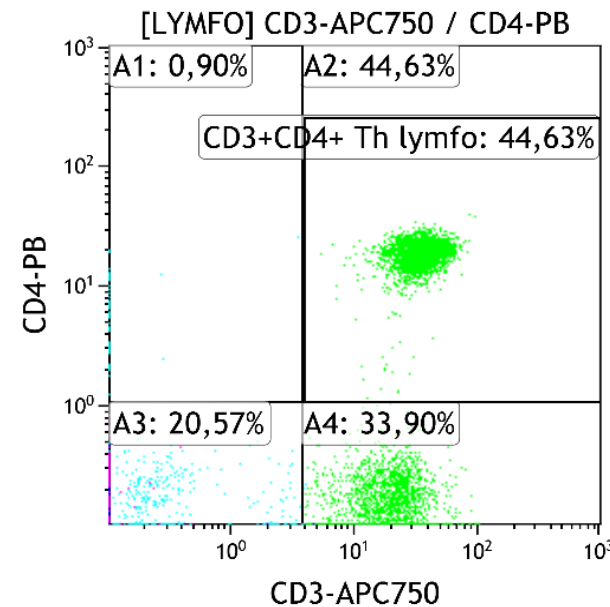
Cytometrický výstup měření

Analýza dat je prováděna pomocí grafických a číselných údajů. Pomocí tzv. gatování lze oddělit jednotlivé populace buněk.

Grafický výstup:



jednparametrový histogram



dvouparametrový scatter plot

CD klasifikace

CD0–9	CD10–19	CD20–29	CD30–39	CD40–49	CD50–59	CD60–69	CD70–79	CD80–89	CD90–99	CD100–199	CD200+
APO2.7	CD10	CD20	CD30	CD40	CD49b	CD61	CD71	CD80	CD99	CD103	CD200
CD1a	CD11a	CD21	CD31	CD41	CD49d	CD62L	CD73	CD81		CD105	CD203c
CD1c	CD11b	CD22	CD32	CD42a	CD49e	CD63	CD79a	CD83		CD106	CD206
CD2	CD11c	CD23	CD33	CD42b	CD52	CD64	CD79b	CD85d		CD107a	CD207
CD3	CD13	CD24	CD34	CD43	CD54	CD65		CD85j		CD109	CD209
CD4	CD14	CD25	CD35	CD44	CD55	CD66b		CD85k		CD116	CD223
CD5	CD15	CD26	CD36	CD45	CD56	CD66c		CD86		CD117	CD235a
CD6	CD16	CD27	CD38	CD45RA	CD57	CD69		CD90		CD122	CD243
CD7	CD18	CD28	CD39	CD45RO	CD58			CD94		CD123	CD244
CD8	CD19	CD29		CD48	CD59			CD95		CD127	CD274
CD8β										CD133	CD278
CD9										CD134	CD279
										CD135	CD294
										CD137	CD300a
										CD138	CD305
										CD141	CD309
										CD144	CD314
										CD146	CD326
										CD152	CD328
										CD154	CD335
										CD157	CD336
										CD158	CD337
										CD159a	CD352
										CD160	CD366
										CD161	CD370
										CD166	
										CD180	
										CD183	
										CD184	
										CD196	
										CD197	

Vyšetřovaný materiál

K nejčastěji vyšetřovanému biologickému materiálu patří:

- periferní krev (K_3EDTA),
- kostní dřeň,
- buněčná suspenze získaná z bioptického vzorku (vzorku tkáně), uzliny,
- jiné tělní tekutiny (likvor, výpotky, BAL...).

Imunofenotypizace

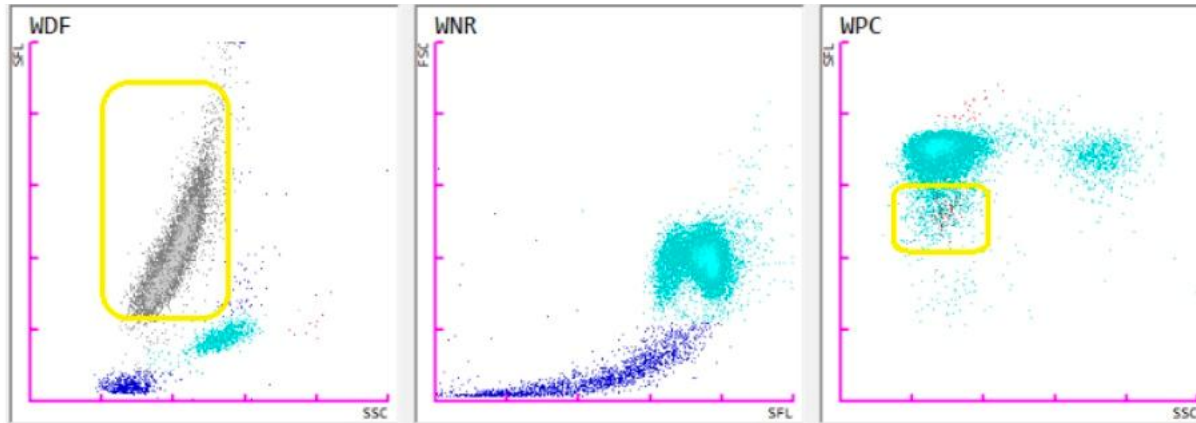
Součást laboratorních diagnostických postupů:

- přítomnosti klonu maligních buněk hematopoetického původu,
- liniová příslušnost buněk,
- rozlišení typů akutních leukémií,
- stupeň diferenciaci.

Příklady onemocnění, využití pro diferenciální diagnostiku:

- akutní leukémie,
- chronická leukémie,
- monoklonální gamapatie.

Nesprávné rozdělení populací buněk v KO

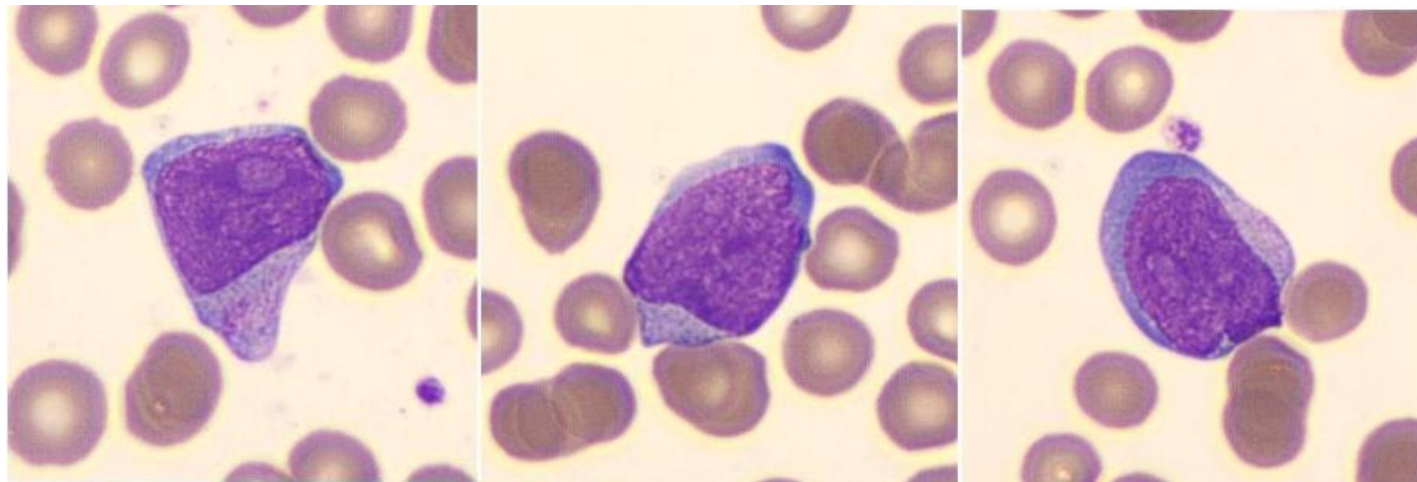


WBC Abn Scattergram
Abn Lympho?
Blasts?

- nesprávné rozdělení populací lymfocytů a monocytů
- došetření diferenciálního rozpočtu leukocytů nátěrem na sklo

CBC			DIFF		
Item	Data	Unit	Item	Data	Unit
WBC	11.55 +	10 ⁹ /L	NEUT#	0.89 *	10 ⁹ /L
RBC	2.50 -	10 ¹² /L	LYMPH#	4.07 *	10 ⁹ /L
HGB	72 -	g/L	MONO#	6.57 *	10 ⁹ /L
HCT	0.220 -	Ratio	EO#	0.01	10 ⁹ /L
MCV	88.0	fL	BASO#	0.01	10 ⁹ /L
MCH	28.8	pg	NEUT%	7.7 *	%
MCHC	327	g/L	LYMPH%	35.2 *	%
PLT &F	191	10 ⁹ /L	MONO%	56.9 *	%
RDW-SD	48.4	fL	EO%	0.1	%
RDW-CV	15.0	%	BASO%	0.1	%
PDW	20.6 *	fL	IG#	0.09 *	10 ⁹ /L
MPV	13.5 *	fL	IG%	0.8 *	%
P-LCR	52.8 *	%			
PCT	0.21 *	%			
NRBC#	0.00	10 ⁹ /L			
NRBC%	0.0	%			

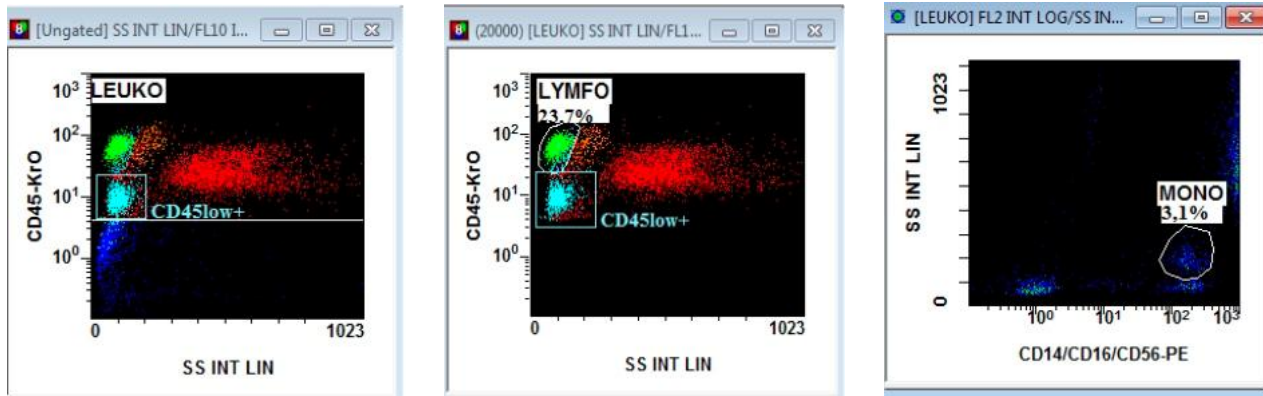
Nátěr na sklo



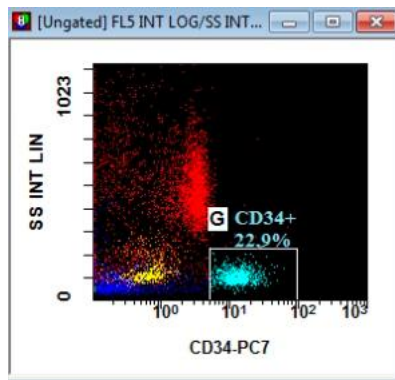
Fotografie z digitálního mikroskopu Cella Vision DM1200.

- Buňky střední velikosti s oválným jádrem, dekonzenzovaným jaderným chromatinem, 2 jadérky. Cytoplazma je v okrajích buňky bazofilní, bez granule, vysoký N/C poměr.

Průtoková cytometrie



- Ve vzorku PK zachyceny buňky CD34+ (22,9 %).



	Sysmex XN 2000	DM 1200	Navios EX
Lymfocyty	35,2 %	22,8 %	23,7 %
Monocyty	56,9 %	1,8 %	3,1 %
Blasty	?	36,1 %	22,9 %

Funkční testy

Cílem provedení funkčních testů je:

- odhalení poruchy ve fungování leukocytů,
- schopnosti jejich aktivace.

Funkční testy lymfocytů:

- aktivitu T lymfocytů,
- aktivitu B lymfocytů,
- aktivitu NK buněk.

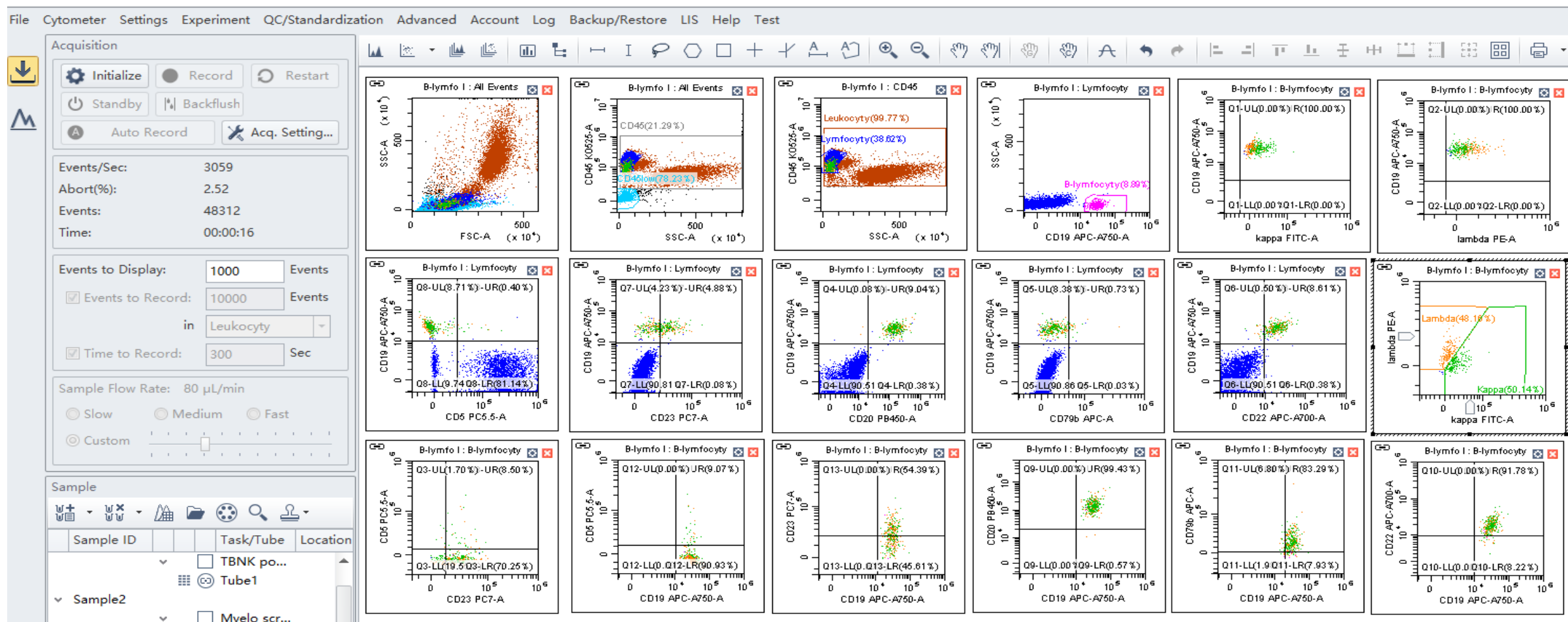
Funkční testy granulocytů:

- aktivita neutrofilních granulocytů (fagocytóza, tzv. burst test),
- aktivita bazofilních granulocytů (alergie, tzv. bazotest).

Výhody a budoucnost

- **Rychlost**
 - Přístroj umožňuje analýzu tisíců buněk za sekundu.
- **Citlivost**
 - Vysoká citlivost, detekce i vzácné buněčné populace ve vzorku.
- **Multiplexní analýza**
 - Jedním měřením lze získat informace o několika parametrech každé jednotlivé buňky.
- **Automatizace a umělá inteligence**
 - Urychlení interpretace dat a zlepšení diagnostiky.

Cytometrický obraz



Elektronická žádanka, blok „Cytometrie“

IRI poměr (LIS *4031)
HLA-B27

Základní screening (LIS *94)
Lymfoproliferace (LIS *4023)
Myeloproliferace (LIS 4021)



K₃EDTA

S těmito metodami je automaticky vždy spojeno „Hodnocení FLOW“. Jedná se o slovní hodnocení VŠ analytikem, lékařem.

Zdroje

Beckman Coulter – Instruction For Use [online]. Poslední revize 30. 9. 2021 [cit, 2022-03-10]. Dostupné z: <https://www.mybeckman.cz/search#q=navios&t=coveo-tab-techdocs>

Ormerod MG. *Flow Cytometry: A Practical Approach*. Third Edition. Oxford; 2000.

Děkuji za pozornost.

Autor: RNDr. Andrea Wagnerová
Kontakt: andrea.wagnerova@tsl.agel.cz

