

Průtoková cytometrie

Stanovení lymfocytárních populací

Materiál:

- Plná krev (EDTA)
- Monoklonální protilátky CD45 FITC, CD3 FITC, CD14PE, CD4 PE, CD16+56 PE, CD8 PC5 a CD19 PC7
- Lyzační roztoky A, B a C

Postup:

- 1) Pro vyšetření každého vzorku si připravte 3 FACS zkumavky (světle modrá barva)
- 2) Zkumavky popište – název vzorku + číslo zkumavky
- 3) Do jednotlivých zkumavek napipetujte monoklonální protilátky dle tabulky:

	FITC (5ul)	PE (5ul)	PC5 (5ul)	PC7 (4ul)
Zkumavka 1	CD45	CD14	X	X
Zkumavka 2	CD3	CD4	CD8	X
Zkumavka 3	CD3	CD16+56	X	CD19

- 4) Odběrovou zkumavku s krví před zahájením práce opatrně promíchejte – stačí 2krát převrátit
- 5) Opatrně odšroubujte víčko odběrové zkumavky a do FACS zkumavek s monoklonálními protilátkami pipetujte 45ul plné krve → **při pipetování dbejte na to, aby stěny zkumavek nebyly potřísněny krví – v opačném případě krev ze stěn co nejdříve setřete pomocí vatové tyčinky**
- 6) Zkumavky s krví a monoklonálními protilátkami inkubujte 30 min ve tmě při laboratorní teplotě
- 7) V průběhu inkubace:
 - Pro stanovení počtu leukocytů odběrovou zkumavku EDTA s krví umístěte na třepačku v laboratoři (cca 3 min)
 - Poté v plné krvi změřte absolutní počet leukocytů na analyzátoru Mythic a hodnotu si zapište – bude třeba pro výpočty
- 8) Po uplynutí inkubace FACS zkumavky vložte do automatického lyzátoru TQ-prep a lyzujte erytrocyty
- 9) Po lýze uchovávejte zkumavky v lednici do doby měření
- 10) Změřte vzorky na průtokovém cytometru Navios – protokol „STUDENTI NOVE“

Hodnocení:

Krevní diferenciál	Fyziologické rozmezí u osob starších 18 let
Leukocyty	4-10 x10 ⁹ /l
Lymfocyty	20-45 %
Monocyty	2-12 %
Granulocyty	48-83 %
Eozinofily	0-8 %
Bazofily	0-1 %
T lymfocyty	55-83 %
Th lymfocyty CD4+	28-57 %
Tc lymfocyty CD8+	10-39 %
B lymfocyty CD19+	6-19 %
NK buňky CD16/56+	7-31 %
Monocyty CD14+HLA-DR+	90-100 %

Hodnotí se procentuální zastoupení lymfocytárních populací ve vzorku, tj

Celkové T-lymfocyty: CD3+: 70%

Pomocné T-lymf.: CD3+CD4+: 40%

Cytotoxické T-lymf.: CD3+CD4+: 28%

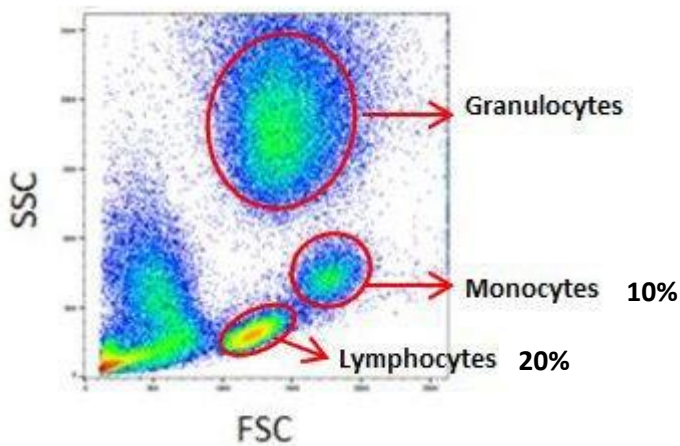
B-lymfocyty: CD19+: 20%

NK-buňky: CD16,56+: 10%

Z takto získaných hodnot a z naměřeného počtu leukocytů se pak vypočítají absolutní počty jednotlivých typů lymfocytů v 1l periferní krve. – viz další strany

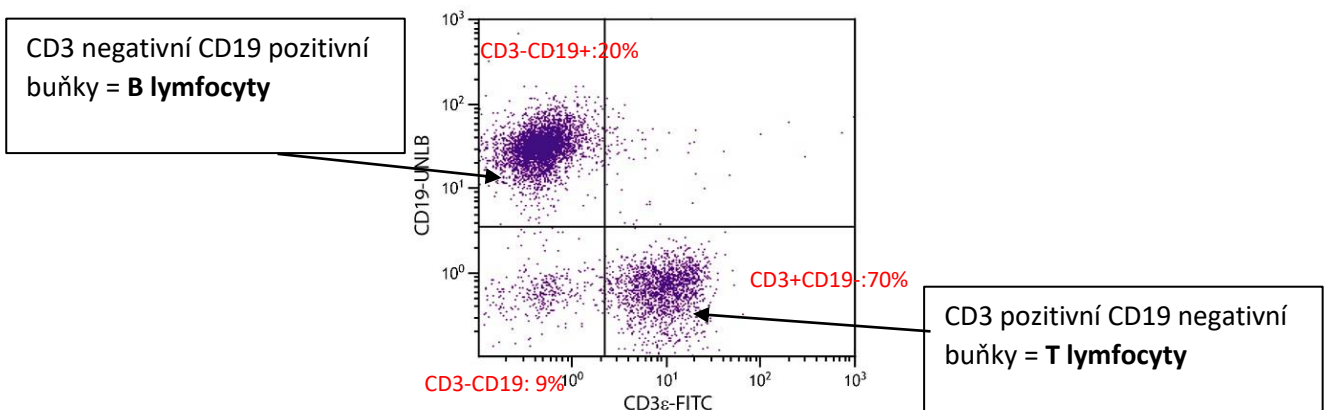
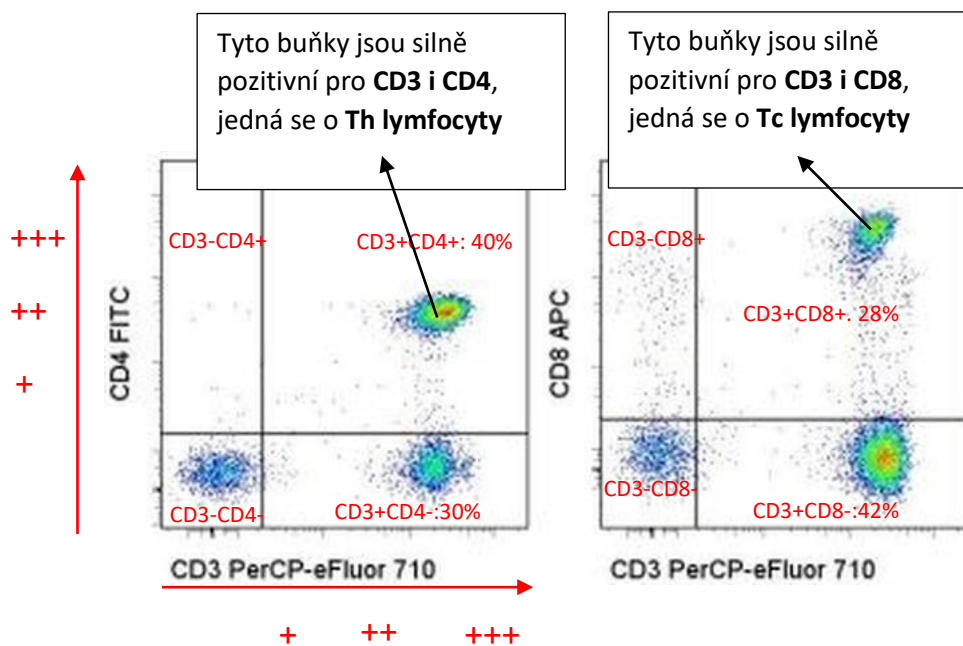
Hodnocení dat z průtokového cytometru:

1) Dot Plot: Forward Scatter (FSC) vs Side Scatter (SSC)



2) Dot Plot: CD znaky značené fluorescenčními barvami

- ve směru **doprava a nahoru** roste pozitivita pro daný znak
- Hodnotí se jasně definovaná populace buněk → tvoří dobře definovaný „shluk“ a minimální počet buněk v jedné populaci musí být >300



Výpočet absolutního počtu lymfocytů - příklad

Naměřený počet leukocytů v krvi pacienta: 5×10^9 leukocytů v 1litru periferní krve.

Z cytometrické analýzy vyplývá, že pacient má 20 % lymfocytů a 10 % monocytů.

Výpočet procenta granulocytů: $100 - (20 + 10) = 70$

Granulocyty tvoří 70 % ze všech leukocytů:

Výpočet absolutního počtu lymfocytů:

100% leukocytů 5×10^9

20% lymfocytů.....x

$$x = (20 * 5 \times 10^9) / 100 = 1 \times 10^9$$

Pacient má 1×10^9 lymfocytů v 1l krve.

Výpočet absolutního počtu celkových T-lymfocytů:

V krvi pacienta bylo naměřeno 70% T-lymfocytů:

Výpočet:

100% 1×10^9

70% T-lymfocytů.....x

$$x = (70 * 1 \times 10^9) / 100 = 0,7 \times 10^9$$

Pacient má $0,7 \times 10^9$ /l celkových T-lymfocytů.

Výpočet absolutního počtu pomocných (CD3+CD4+) T-lymfocytů:

V krvi pacienta bylo naměřeno 40 % pomocných T-lymfocytů:

Výpočet:

100% 1×10^9

40% CD3+4+T-lymfocytů.....x

$$x = (40 * 1 \times 10^9) / 100 = 0,4 \times 10^9$$

Pacient má $0,4 \times 10^9$ /l pomocných T-lymfocytů.

Vypočti absolutní počet cytotoxických T-lymfocytů, B-lymfocytů a NK buněk:

Výsledky měření:

Celkové T-lymfocyty: CD3+: 70%

Pomocné T-lymf.: CD3+CD4+: 40%

Cytotoxické T-lymf.: CD3+CD4+: 28%

B-lymfocyty: CD19+: 20%

NK-buňky: CD16,56+: 10%

Počet leukocytů: 5×10^9 /l.

20% lymfocytů

10% monocytů