

Průtoková cytometrie a stanovení lymfocytárních subpopulcí

Jana Nechvátalová

Ústav klinické imunologie a alergologie

FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



Eosinophil



Basophil

Rozdělení imunologických laboratorních metod

serologické (humorální)- detekce antigenů a protilátek,
průkaz tvorby protilátek proti infekčním agens

buněčné- stanovení počtu (relativního, absolutního) a funkčnosti
jednotlivých typů leukocytů

- odběr nesrážlivé krve do EDTA, heparinu, citrátu sodného



Monocyte



Lymphocyte



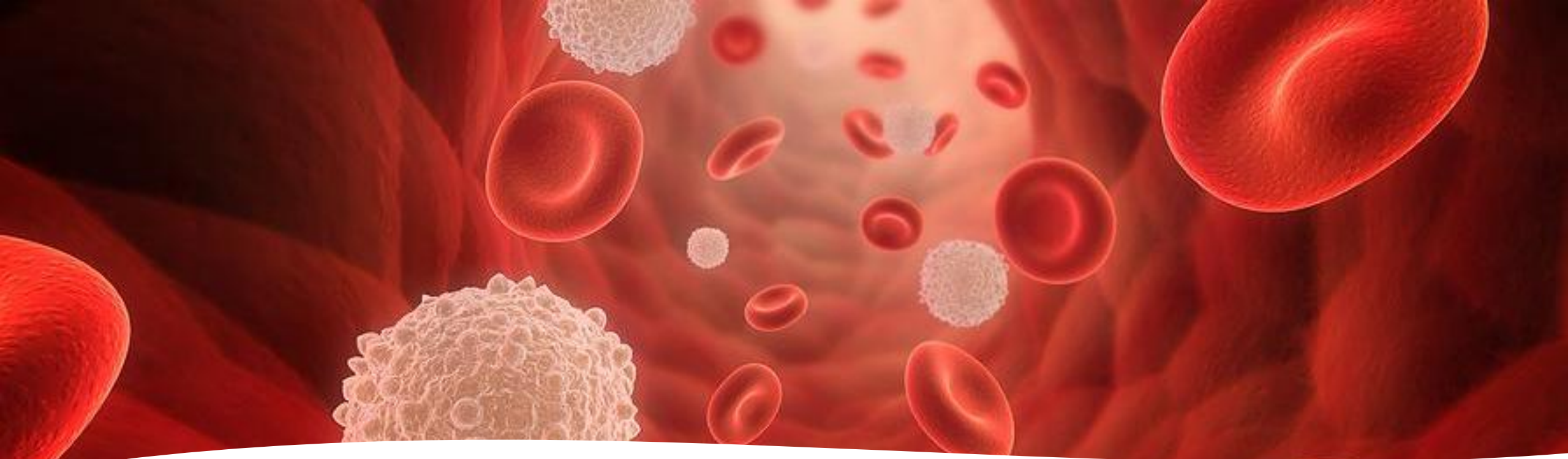
Neutrophil



Eosinophil



Basophil

A detailed illustration of a blood smear. It features several large, biconcave red blood cells (erythrocytes) in shades of red. Interspersed among them are smaller, white, spherical white blood cells (leukocytes) with visible nuclei. The background is a soft-focus red, suggesting the interior of a blood vessel.

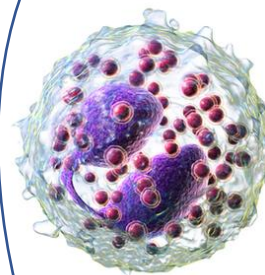
Imunofenotypizace buněk

- stanovení leukocytárních subpopulací pomocí průtokové cytometrie (FACS- fluorescent-activated cell sorting)
- odběr krve do zkumavky s EDTA

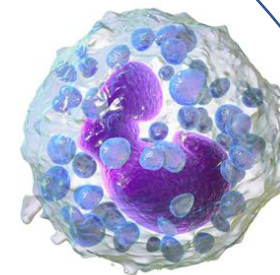




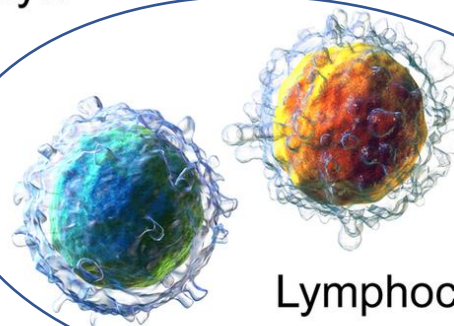
Monocyte



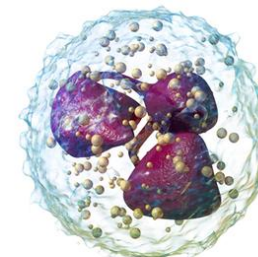
Eosinophil



Basophil



Lymphocytes



Neutrophil

Granulocyty

LYMFOCYTY

T-lymfocyty (Th CD4+; Tc CD8+)

B-Lymfocyty

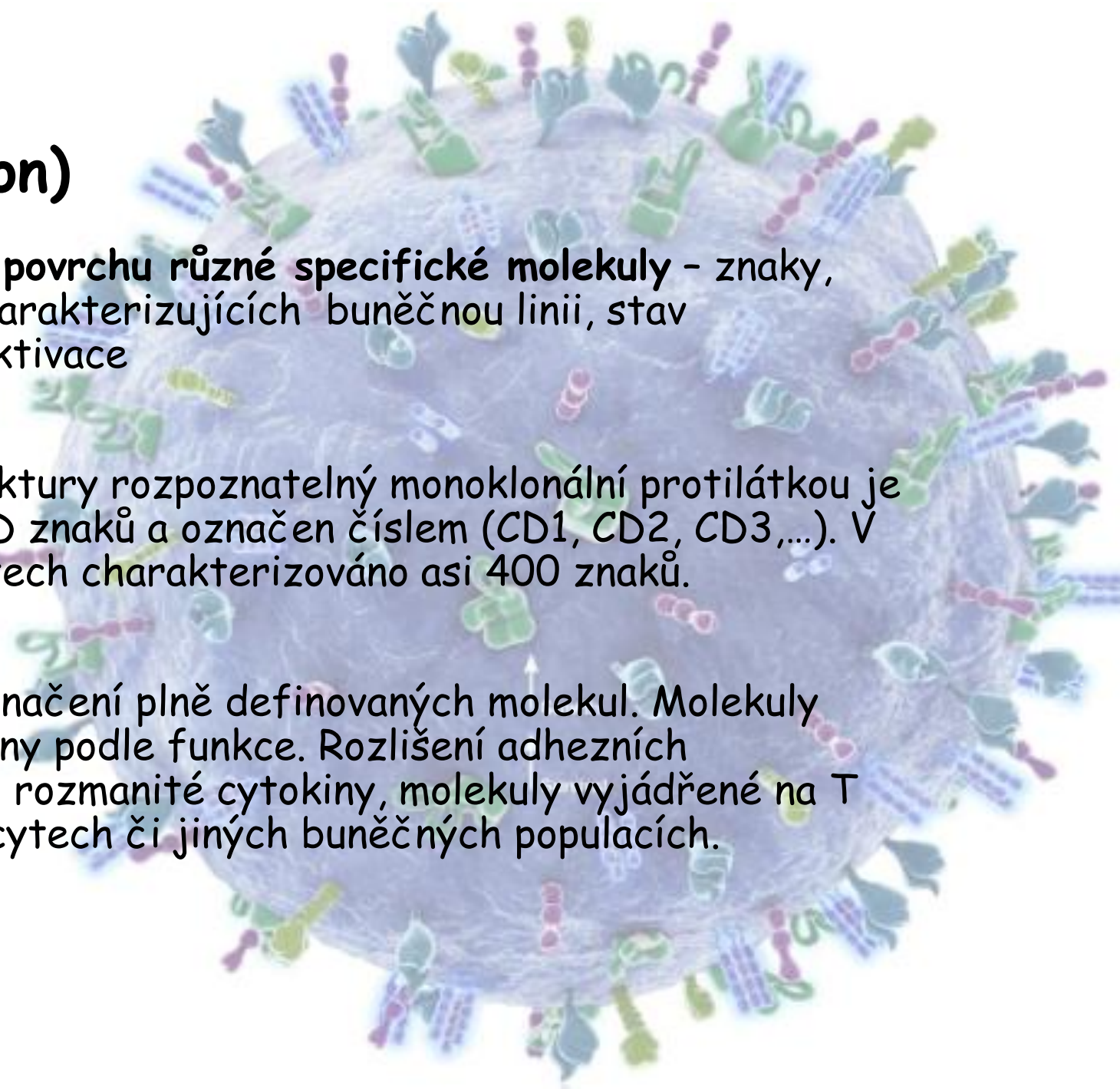
NK bunky

White Blood Cells

Leukocyty: počet leukocytů v krvi: $4-9 \times 10^9/l$

Cluster Designation (Cluster of Differentiation)

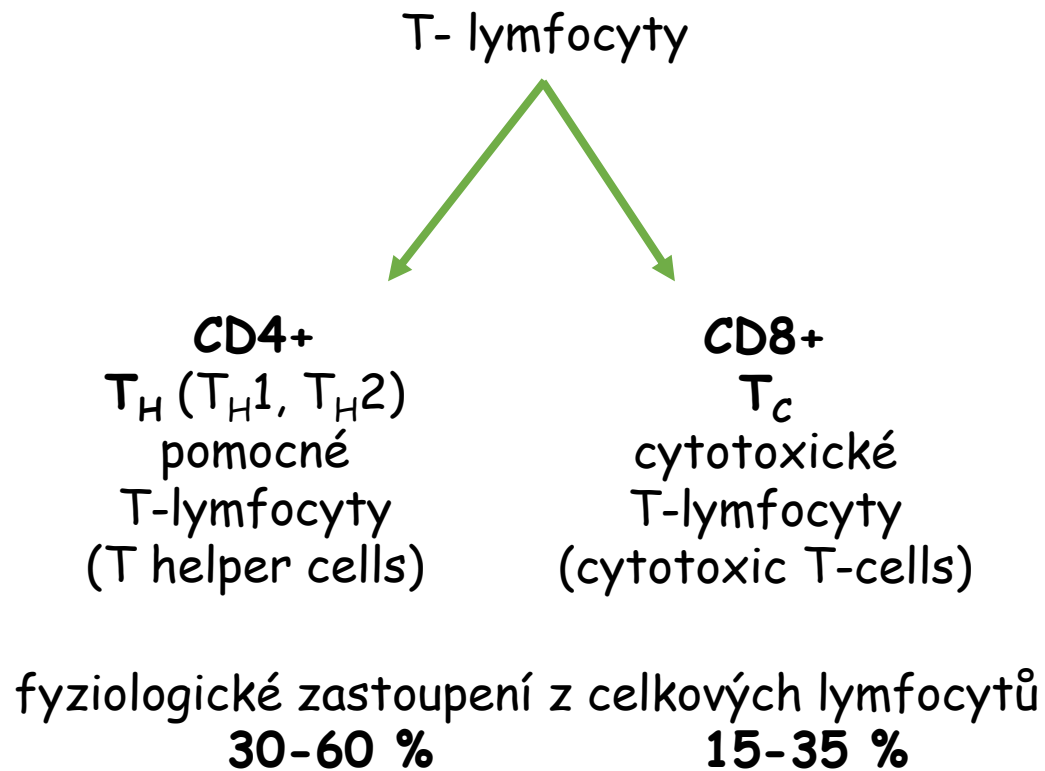
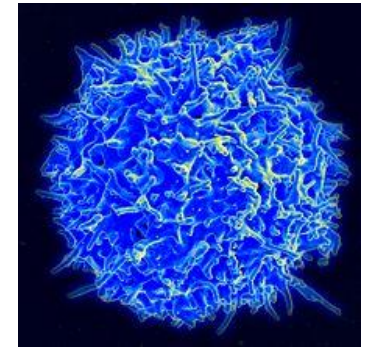
- buňky exprimují (vystavují) na svém povrchu různé specifické molekuly - znaky, které můžeme uspořádat do skupin charakterizujících buněčnou linii, stav diferenciaci jednotlivé buňky a její aktivace
- **CD klasifikace:** znak definované struktury rozpoznatelný monoklonální protilátkou je zařazen do skupiny diferenciačních CD znaků a označen číslem (CD1, CD2, CD3,...). V současné době je na lidských leukocytech charakterizováno asi 400 znaků.
- **Využití:** CD znaky jsou používány k označení plně definovaných molekul. Molekuly zařazené do CD klasifikace jsou členěny podle funkce. Rozlišení adhezních membránových molekul, receptory pro rozmanité cytokiny, molekuly vyjádřené na T lymfocytech, B lymfocytech, trombocytech či jiných buněčných populacích.



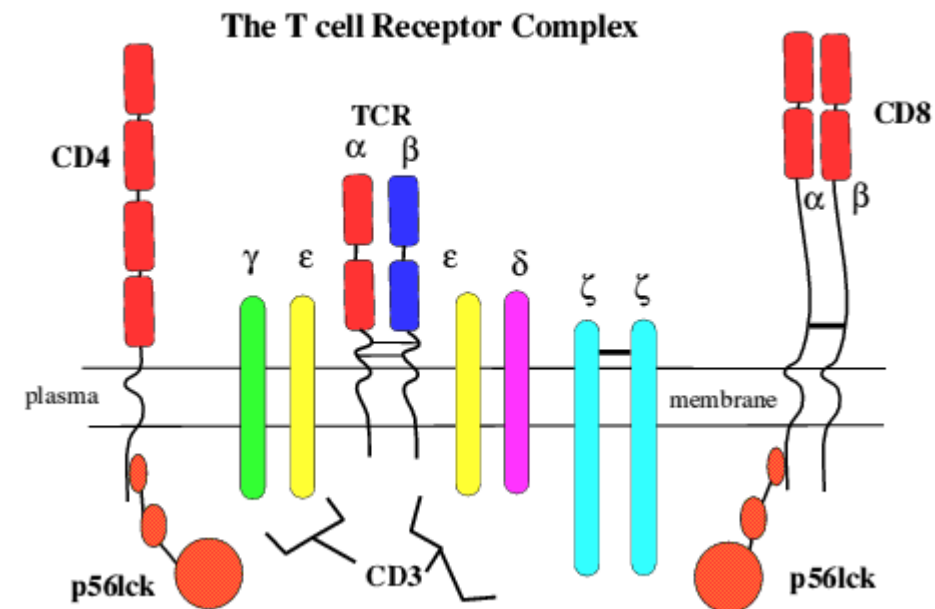
T lymfocyty

CD3 - povrchová molekula přítomná na všech T-lymfocytech

Fyziologické zastoupení v periferní krvi: **58-85 % z lymfocytů**



Stavba T- buněčného receptoru TCR a umístění podjednotek CD3 a koreceptorových molekul CD4, CD8 zapojených do signalizace přes T- buněčný receptor TCR.

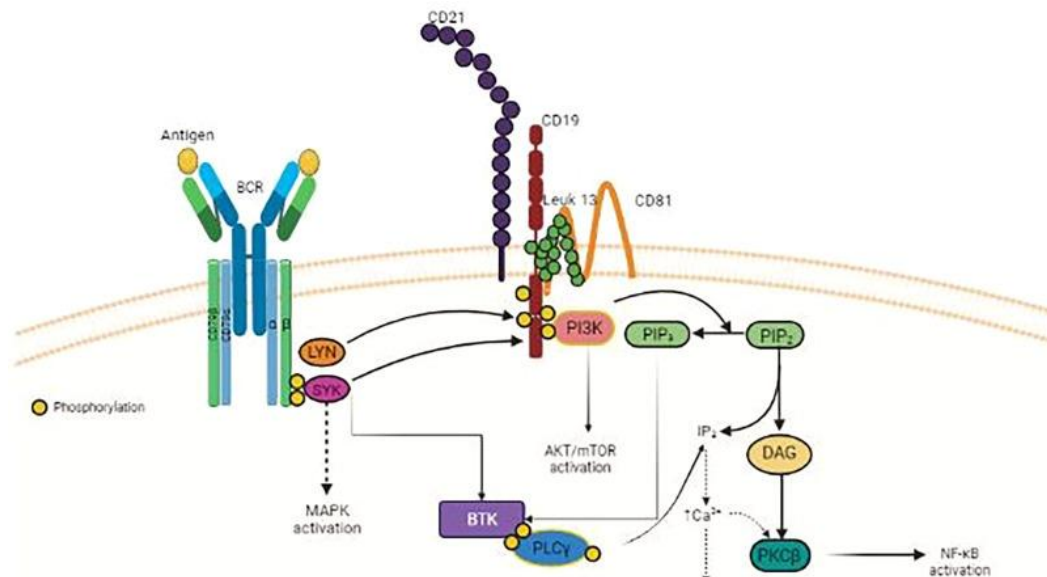


B lymfocyty

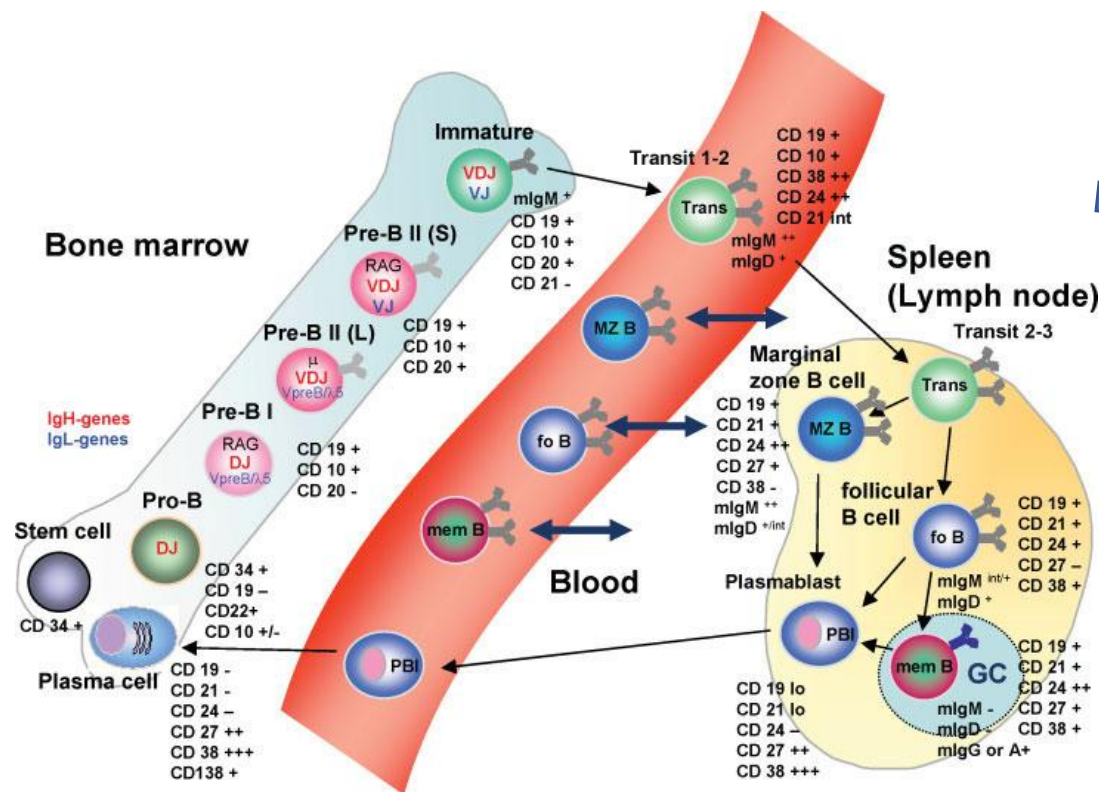
CD19, CD20 - povrchové molekuly využívané k detekci B lymfocytů v průtokové cytometrii

Vhodně zvolená kombinace dalších CD znaků slouží k charakterizaci jednotlivých diferenciačních stadií

CD19 je kostimulační receptor - neváže ligand
- moduluje signály z jiných receptorů



<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0268960X22000765-gr1.jpg>



Expresse CD znaků na povrchu B lymfocytů během jejich vývoje v kostní dřeni, sekundárních lymfatických orgánech a periferní krvi

NK buňky

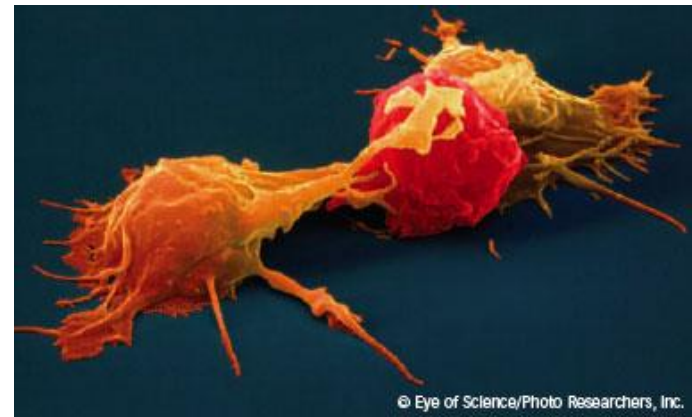
CD56

adhezní molekula

CD16 (FC γ RIII)

receptor pro Fc část protilátky IgG

- po navázání ligandu se spustí ADCC (cytotoxicita závislá na protilátkách) - dochází k lýze cílových buněk NK buňkami



Na povrchu nemají CD3! jsou tedy CD56+CD16+CD3-

- rozeznávají buňky, které mají na povrchu abnormálně málo MHC I - nádorové a virově infikované buňky
- používají cytotoxické mechanismy (perforin, granzymy - perforin vytvoří v membráně buňky póry, kterými dovnitř pronikne granzym a zahájí apoptózu cílové buňky)

Fyziologické zastoupení v periferní krvi: **6-20 % z lymfocytů**

Pozor!

NK T buňky: CD16+, CD56+, CD3+

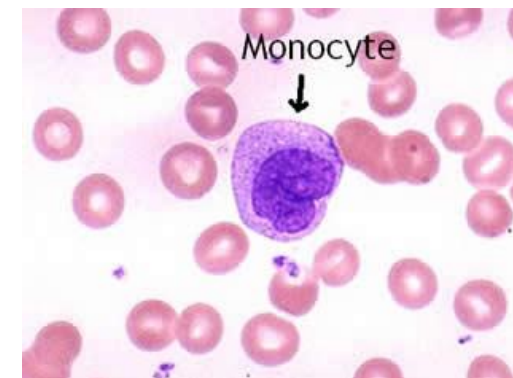
Monocyty

CD14 - povrchová molekula charakteristická pro monocyty
Fyziologické zastoupení v periferní krvi: **0-10 % z leukocytů**

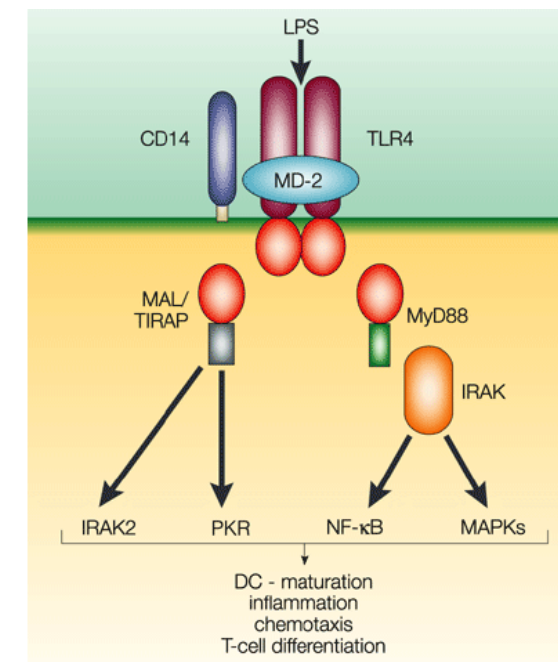
- součást nespecifické imunity
- schopnost fagocytózy
- tkaňová forma = makrofág

Na svém povrchu exprimují HLA DR
(Human Leukocyte Antigen DR isotype)

- navázání peptidů z pohlcených patogenů →
→ rozpoznání pomocnými T-lymfocyty
- APC = antigen prezentující buňka



CD14 jako koreceptor TLR4
- rozpoznání bakteriálních lipopolysacharidů (LPS)



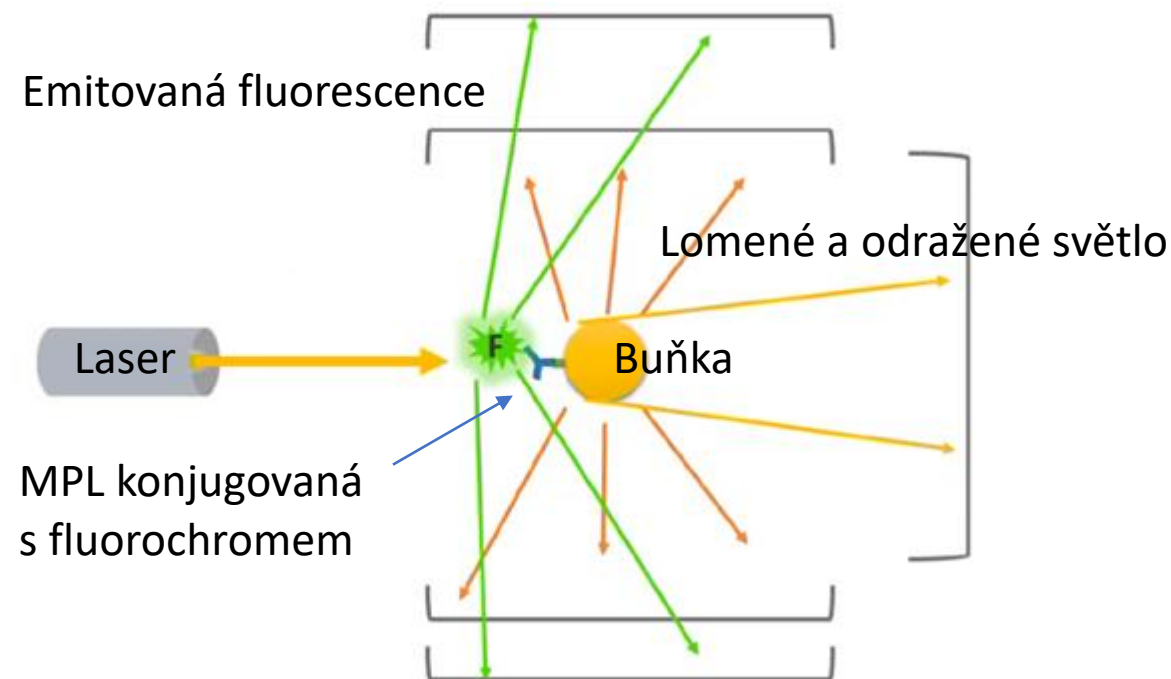
flow+cyto+metrie - „měření buněk v pohybu“

- **Průtoková cytometrie** je technologie umožňující současně měření a analýzu několika fyzikálních a chemických vlastností jednotlivých částic, které jsou unášeny v proudu kapaliny a prochází paprskem světla
- možnosti analýzy mnoha vlastností a charakteristik na úrovni jedné buňky během krátkého časového úseku
- určování fenotypu buněk (imunofenotypizace) - měření současně více než 20 markerů na jedné buňce
- monitorování odpovědi na léčbu, výzkum signálních drah



Co měříme:

- **Lomené a odražené světlo** - při průchodu buněk laserovým paprskem dochází k jeho lomu a odrazu na buněčném povrchu a buněčných organelách
- **Emitovanou fluorescenci** - pokud použijeme MPL konjugované s fluorochromem
- částice velikosti 0,2-150 μm
 - prokaryotické a eukaryotické buňky
 - virové částice, bakterie, houby
 - komplexy Ag-Ab



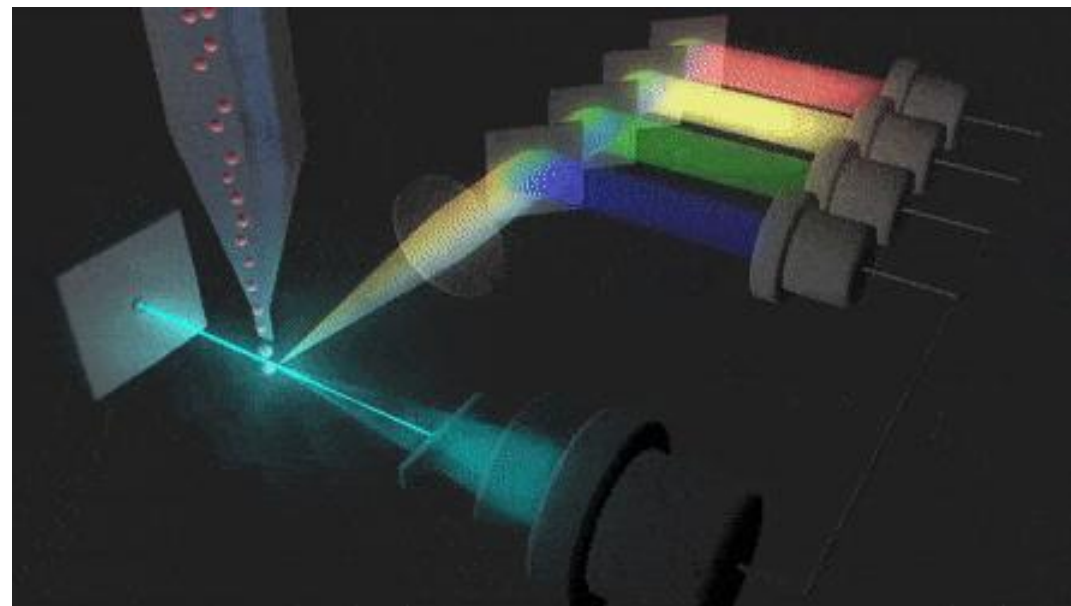
Princip průtokové cytometrie

Při průchodu částic laserovým paprskem dochází k rozptylu světla a k fluorescenci navázaných fluorochromů

Světelné signály jsou převedeny na elektrické pomocí detektorů (fotonásobiče)

Na každé buňce je možné změřit několik parametrů zároveň

Naměřená data se ukládají a dále analyzují

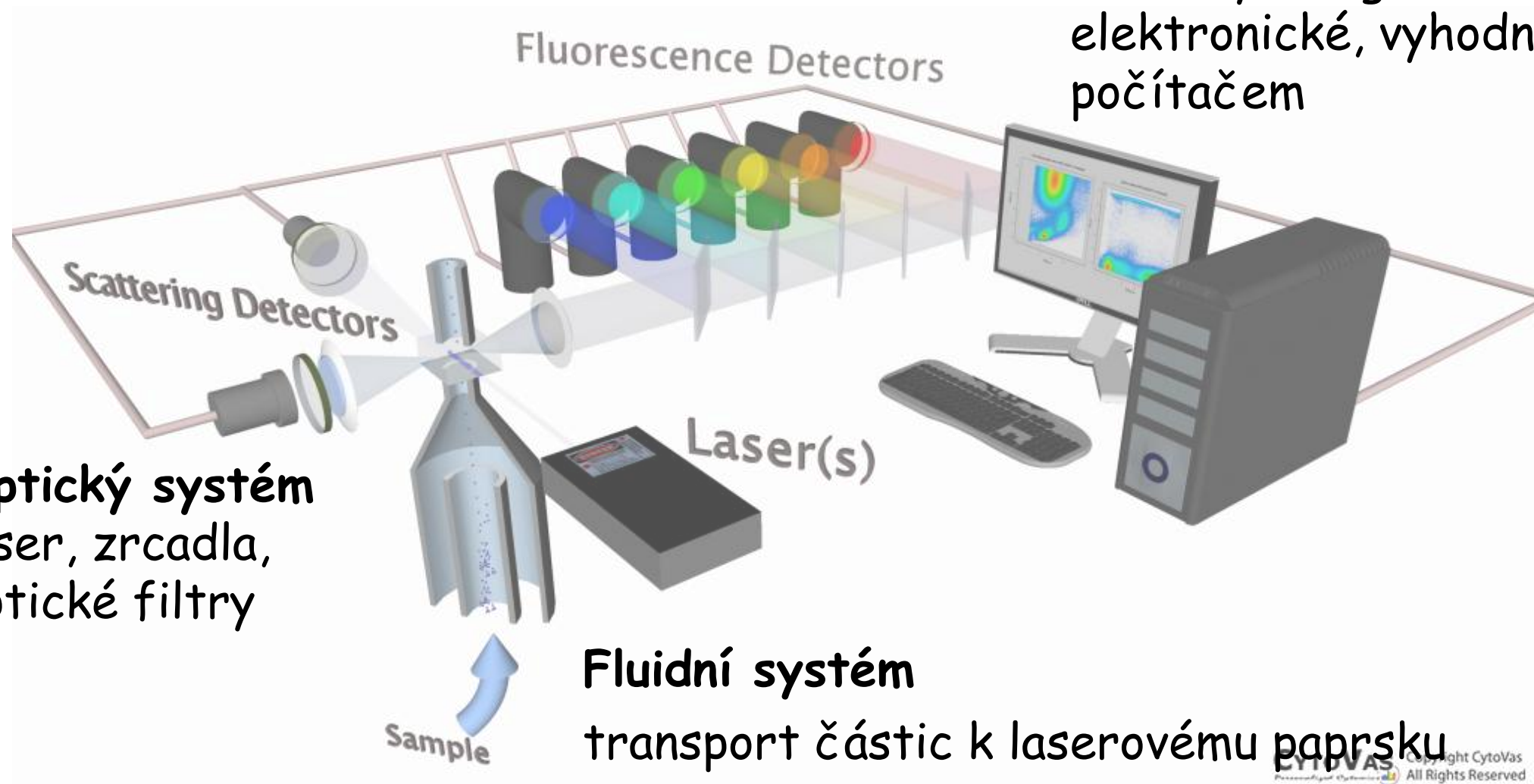


**Cytometr je tvořen
třemi hlavními systémy**

Elektronický systém
převod detekovaných
světelných signálů na signály
elektronické, vyhodnocované
počítačem

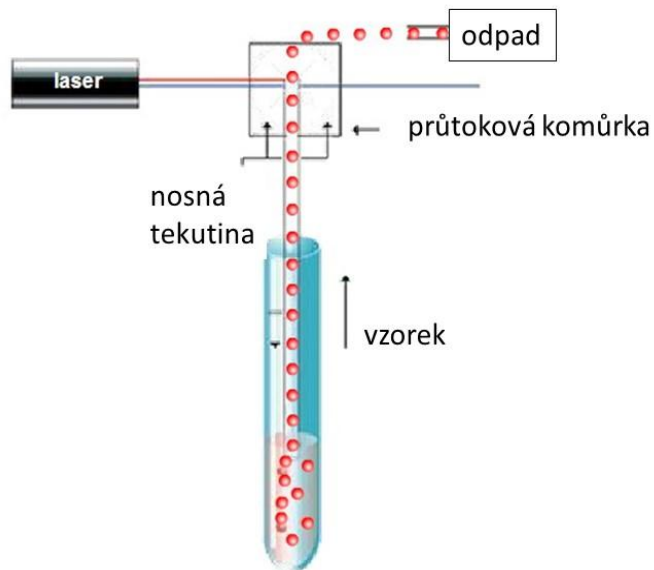
Optický systém
laser, zrcadla,
optické filtry

Fluidní systém
transport částic k laserovému paprsku



Fluidika

- zajišťuje transport bb. v nosné tekutině (pod tlakem) do průtokové komory
- buňky se pohybují jedna za druhou



Řez průtokovou komorou:
uprostřed vzorek (bunečná suspenze)
unášaná nosnou kvapalinou (sheath
fluid)



Hydrodynamická fokusace

- rozdíl v tlaku a rychlosti nosné tekutiny a suspenze částic zabezpečuje uspořádání buněk jednotlivě za sebou

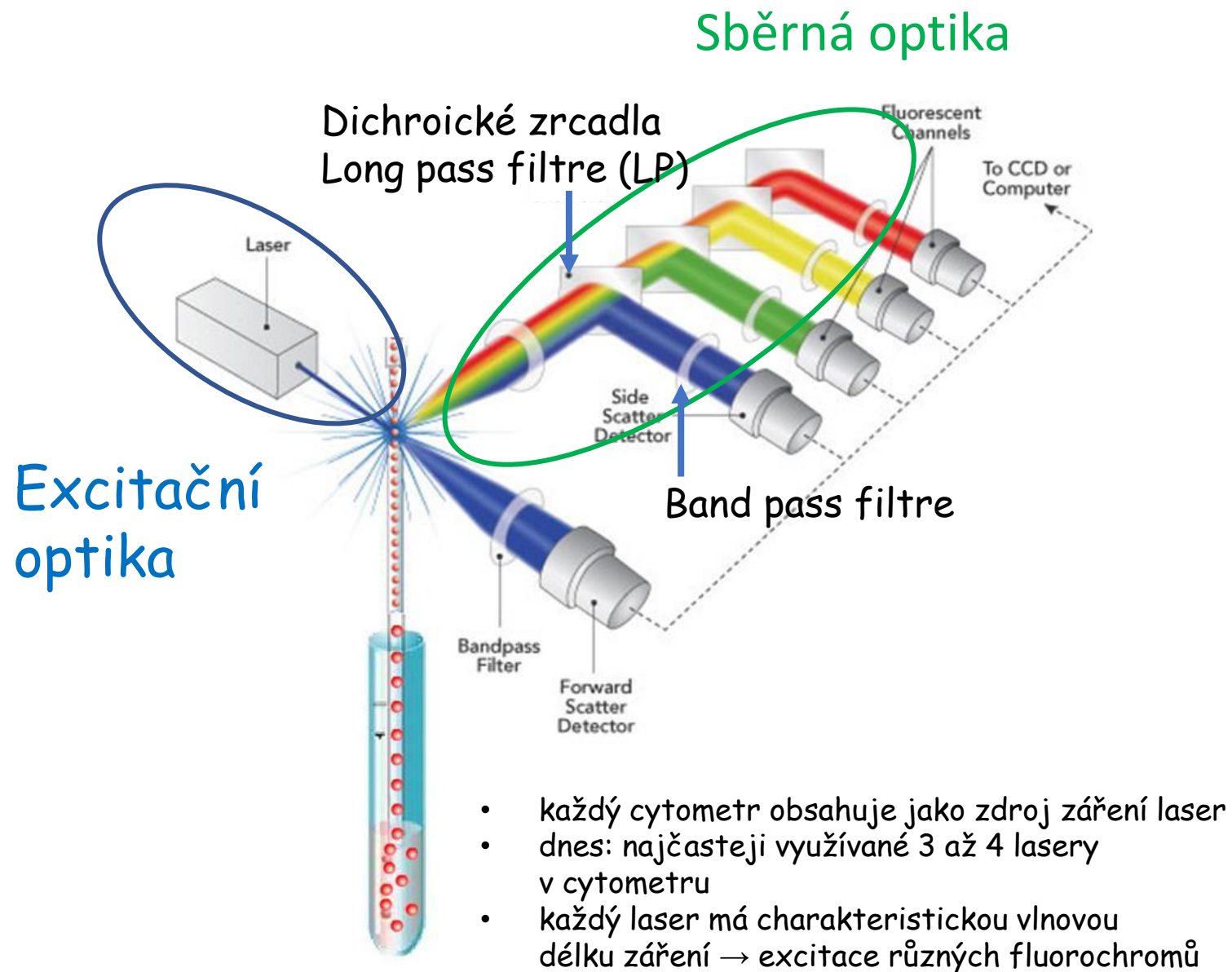
Optika

- **Excitační optika**

laser a systém čoček, které zaostřují a směřují laserový paprsek - před ozářením částic

- **Sběrná optika**

soustava čoček, která vede a rozděljuje světlo do různých vlnových délek na příslušné detektory - odražené a fluorescenční záření po ozáření částic

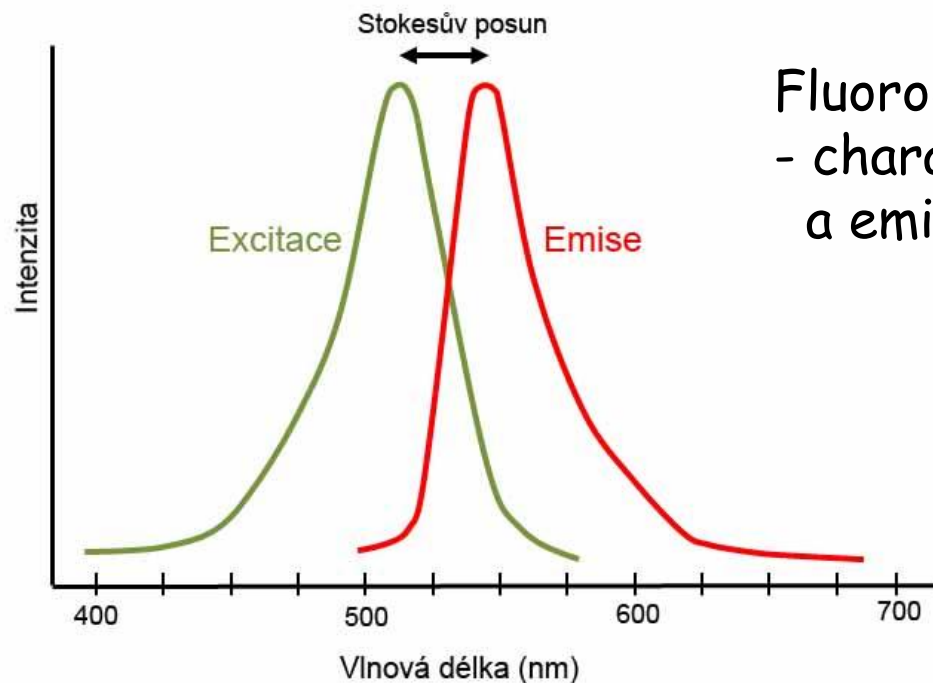
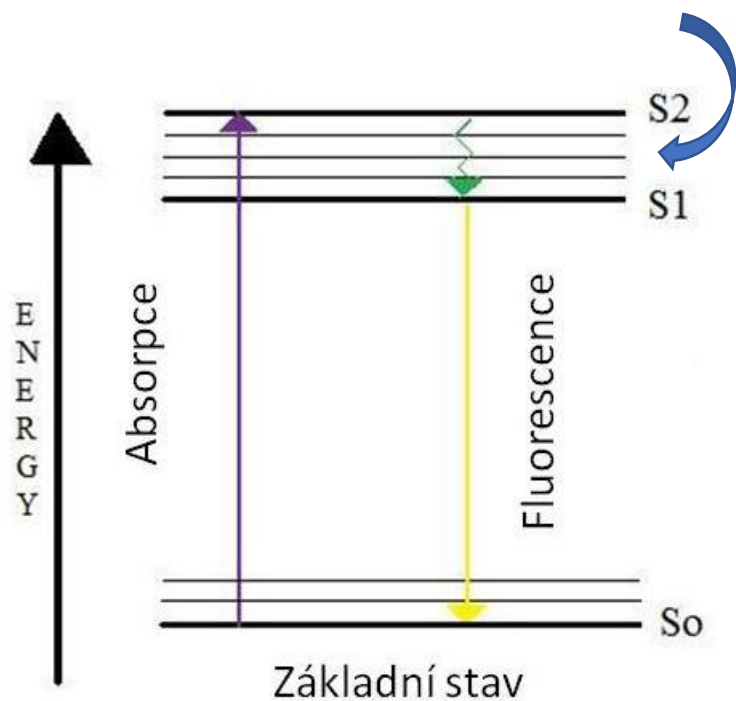


Fluorescence

- fluorochrom je molekula schopná absorbovat záření specifické vlnové délky (excitace) a následně vyzářit kvantum energie (emise) vo formě fluorescenčního záření
- monoklonální Ab značené **fluorochromomy** - specifické k určitému epitopu

Emitované záření má nižší energii a větší vlnovou délku ($E = h \cdot c / \lambda$)

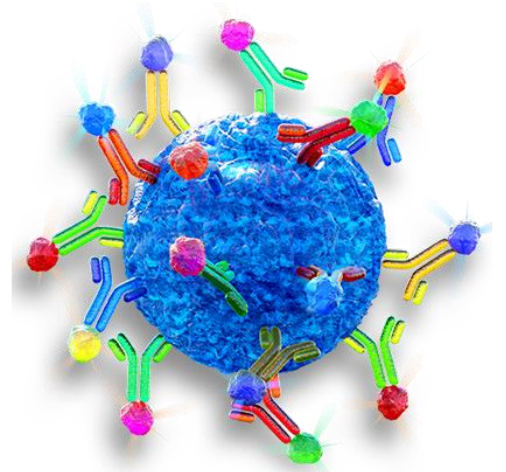
- částečná ztráta energie (přeměna na teplo) = Stokesův posun



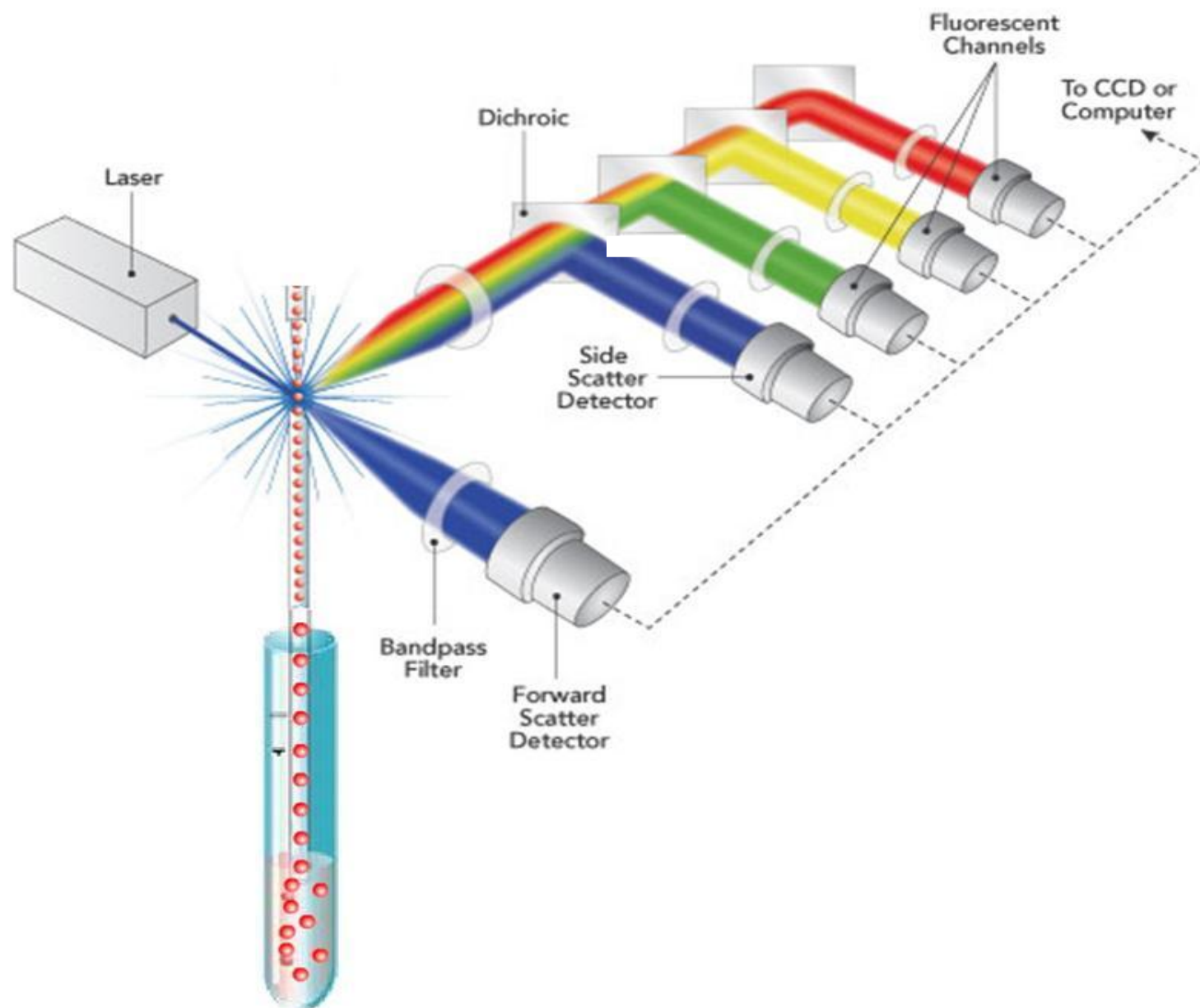
Fluorochrom
- charakteristické excitační
a emisní spektrum

Fluorochromy

- jsou excitované vhodnou vlnovou délkou (nutné zvolit správný laser)
- emitují světlo specifické vlnové délky (nutné zvolit detektor ve správném pásmu vlnových délek)
- i neznačené bunky mohou být fluorescenční kvůli slabé **autofluorescenci**
- Polycyklické organické molekuly a jejich deriváty
 - **Fluorescein isothiokyanát (FITC)**, Cyaniny, Texas Red, řada Alexa, Pacific a Cascade
 - AmCyan, Propidium Iodide, 7-AAD, CFSE
- Fluorescenční proteiny
 - **Phycoerythríny (PE)**, Allophycocyaniny, PerCP, GFP,...

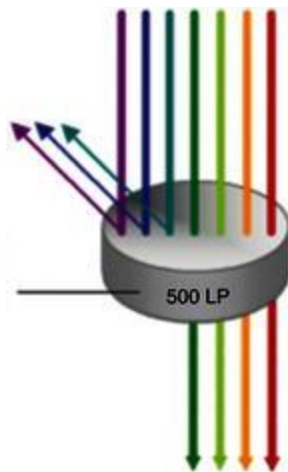


Schopné absorbovat fotony budícího záření (napr. 488 nm) a následně (10⁻⁸ s) emitovat fotony s delší vlnovou délkou (nap. 500 - 800 nm). Fluorescenční záření má tedy jinou „barvu“.



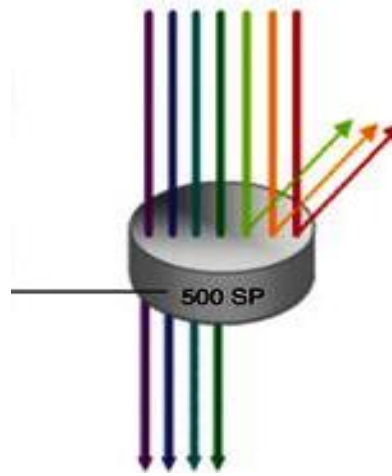
Optické filtry

Long Pass filtry (LP)
propouští všechny délky
vyšší než specifikovaná
vlnová délka



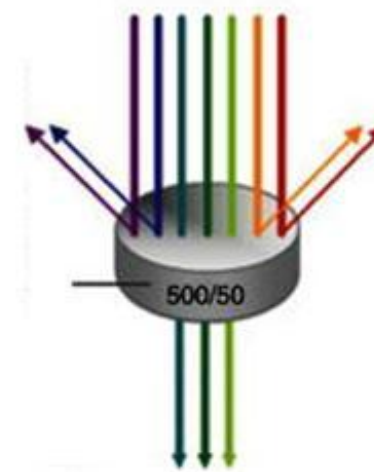
500LP

Short Pass filtry (SP)
propouští všechny délky
kratší než specifikovaná
vlnová délka



500SP

Band Pass filtry (BP)
propouští specifické
rozmezí vlnových délek



500/50
500±25

Dichroické filtry - umístěny pod úhlem 45°
část světla odráží pod úhlem 90°, část propouští

Elektronika

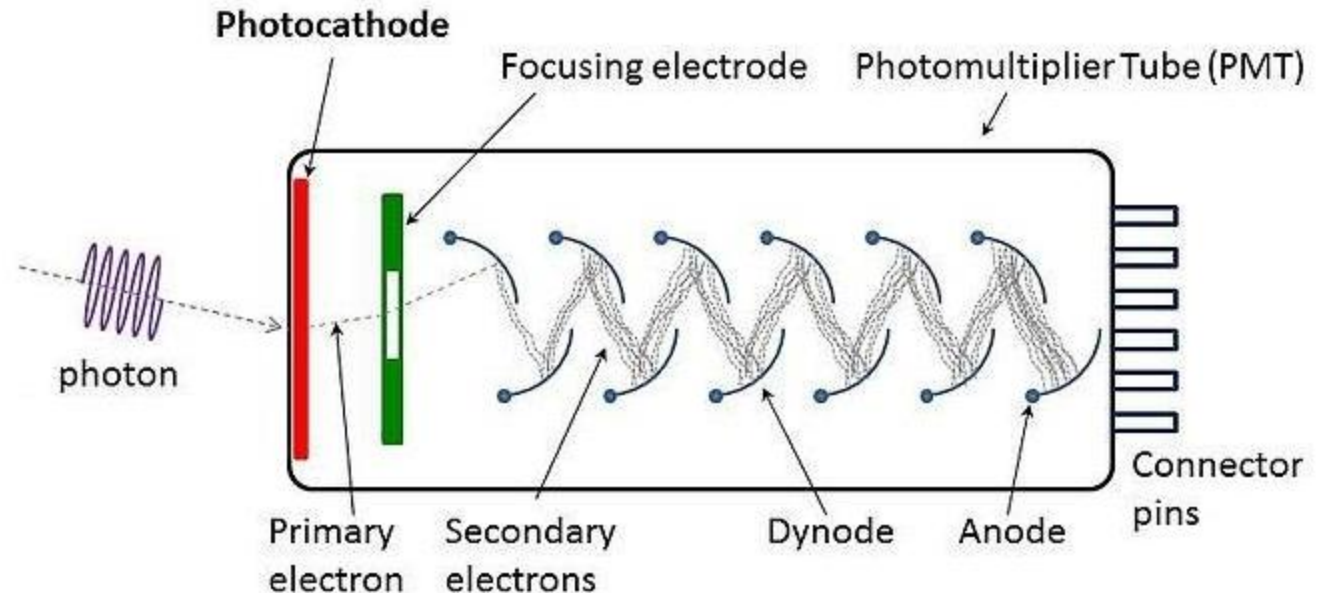
- světelné signály jsou převáděny na elektrické
- typy detektorů:
 - fotodiody: detekce FSC
 - fotonásobiče PMT (PhotoMultiplierTube): detekce SSC a fluorescence

Princip PMT

Záření ve formě fotonů dopadá na fotokatodu. Z ní jsou na základě fotoelektrického jevu vyraženy elektrony, které jsou dále usměrněny na tzv. dynody (katody s pozitivním napětím). Na jednotlivé dynody je přiváděno stále vyšší napětí, což umožňuje urychlení elektronů a zvýšení jejich energie. Urychlené elektrony mají dostatek energie na vyražení dalších elektronů z povrchu dynod. Počet elektronů exponenciálně roste. Vyražené elektrony dopadají nakonec na anodu, na které dochází ke vzniku napěťového pulzu. PMT umožňuje přeměnit slabý počáteční signál na silný napěťový pulz.

PMT

- velmi citlivé, jsou schopné zachytit i slabé signály
- zvyšují signál primárního dopadajícího záření



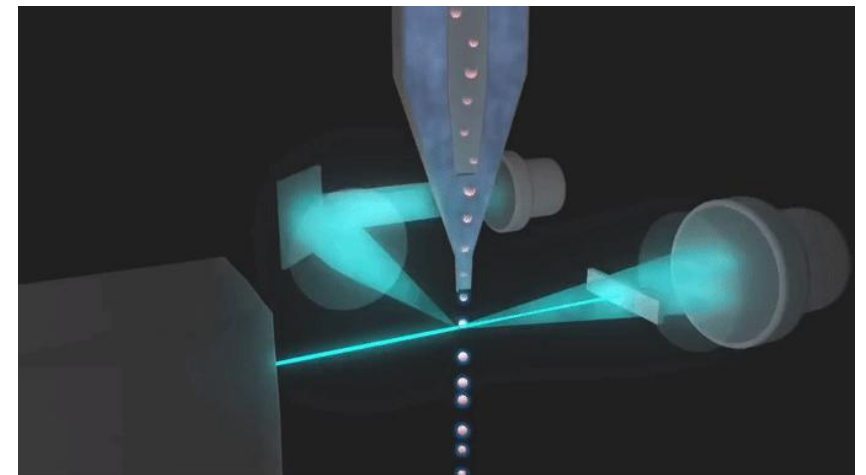
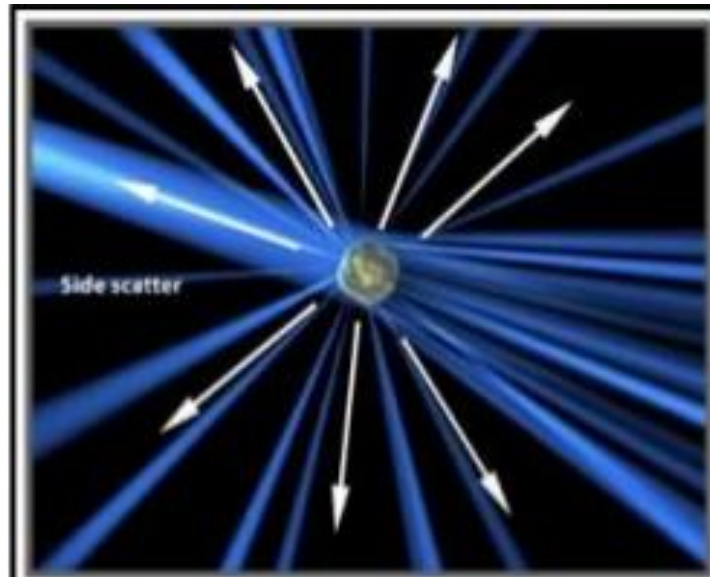
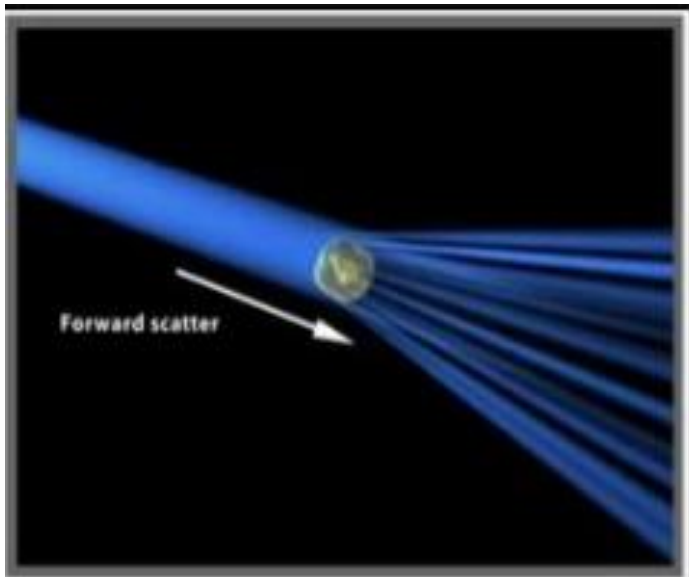
Velikost vs. granularita

Velikost a členitost buňky určujeme na základě rozptylu záření: procházející částice vychýlí dopadající záření

Forward Scatter (FSC) - rozptyl záření v přímém směru → závisí na velikosti buněk = určuje velikost

Side Scatter (SSC) - rozptyl záření do stran → závisí na členitosti buněk = určuje granularitu

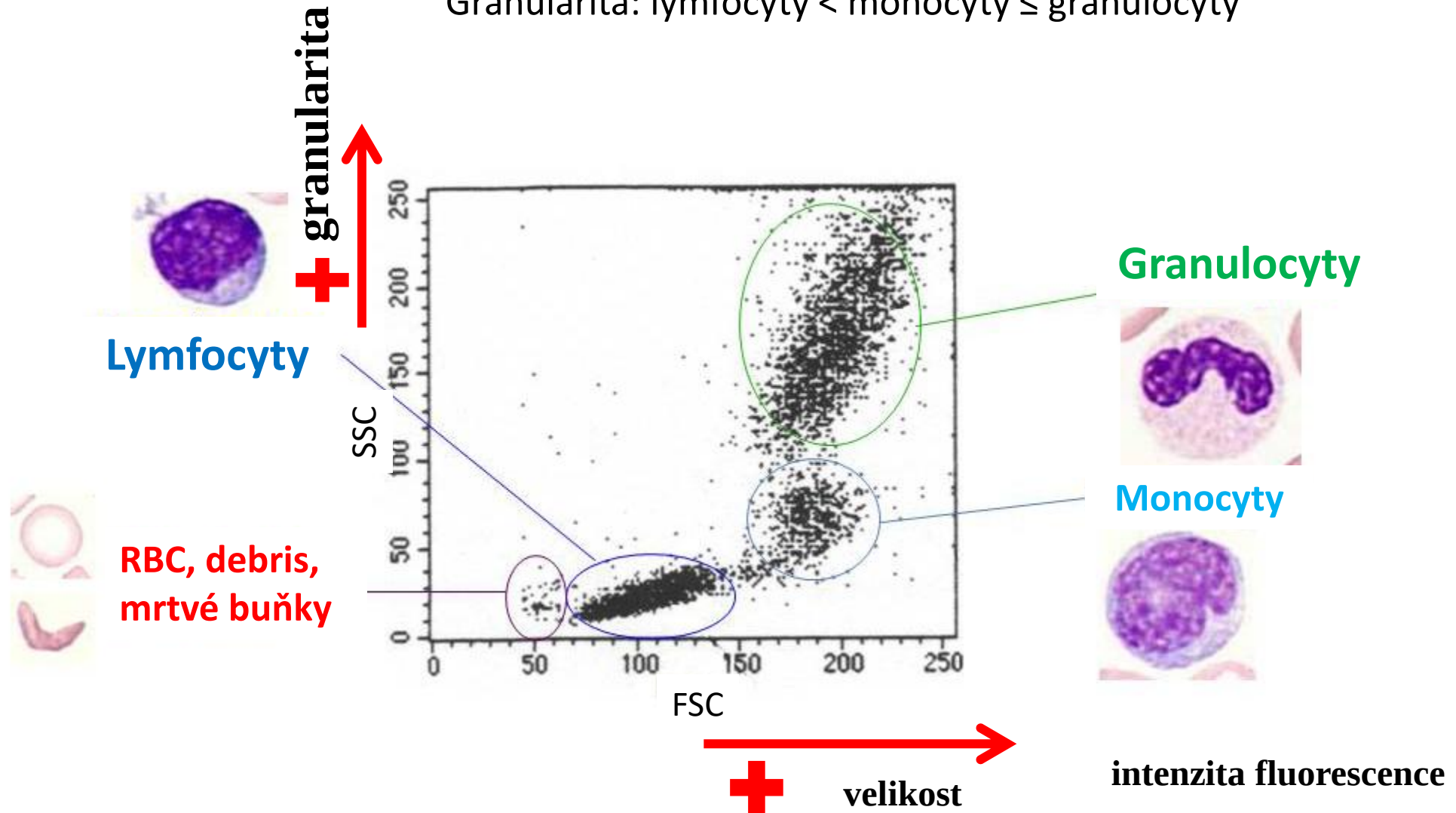
- stačí jeden laser
- nejedná se o fluorescenční záření (nepotřebujeme MPL s fluorochromy)



Kombinací FSC a SSC – rozdělení základních subpopulací leukocytů

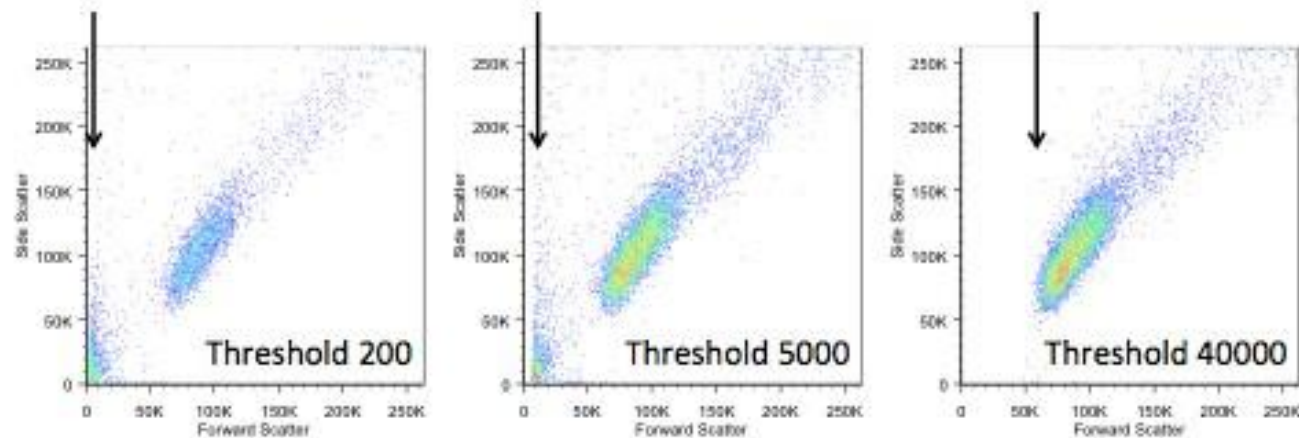
Velikost: lymfocyty < monocyty < granulocyty

Granularita: lymfocyty < monocyty ≤ granulocyty



Threshold (práh)

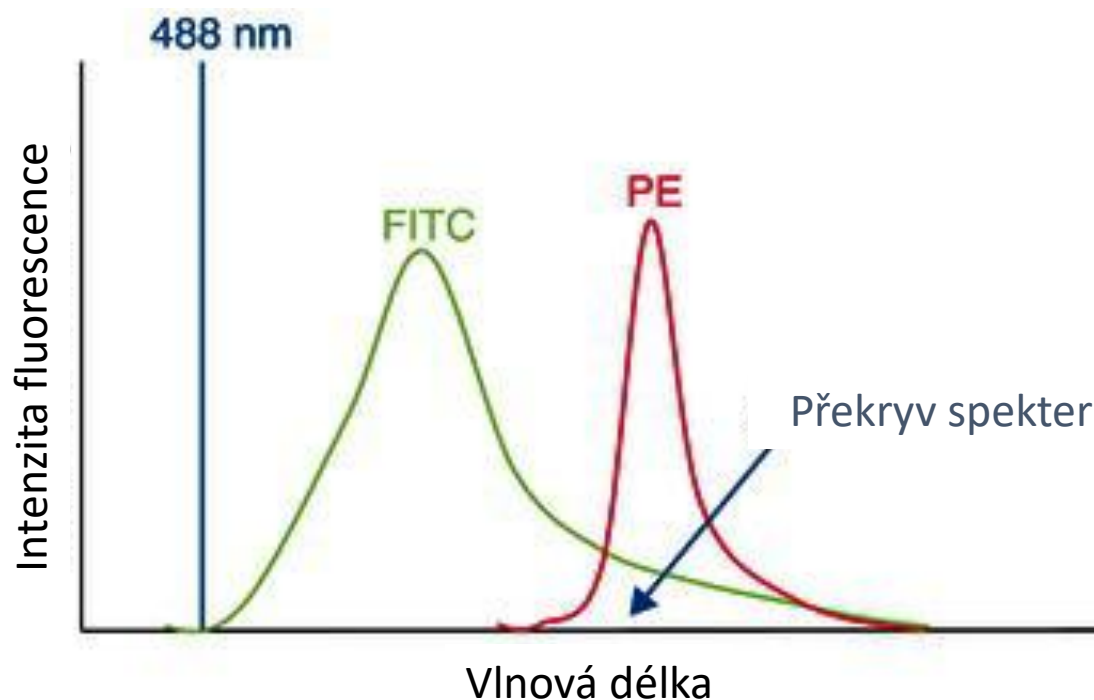
- Detektory jsou extrémě citlivé a detekují signály z různých zdrojů - prach, malé částice, debris
- K jejich eliminaci je třeba nastavit threshold (potlačení podprahového signálu)
- Nastavuje se na jednom parametru - při imunofenotypizaci většinou FSC

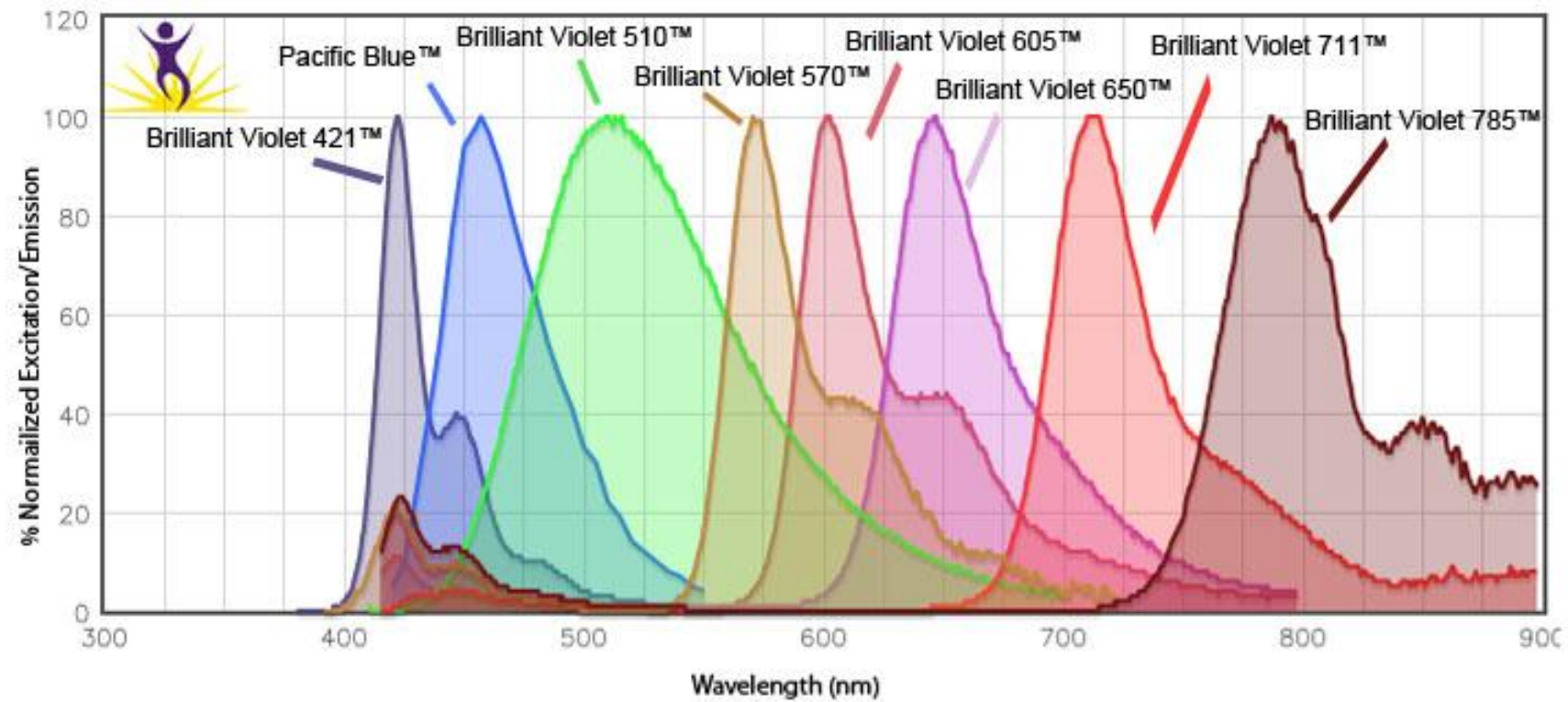


Překryv spekter

Fluorochromy typicky emitují světlo v širokém spektru vlnových délek

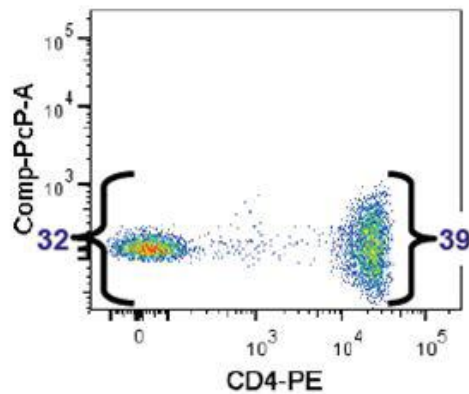
V závislosti na uspořádání filtrů, detektory mohou zachytit fluorescenci od jiných fluorochromů, které jsou detekovány v jiných kanálech (tzv. přesvit, překryv spekter)



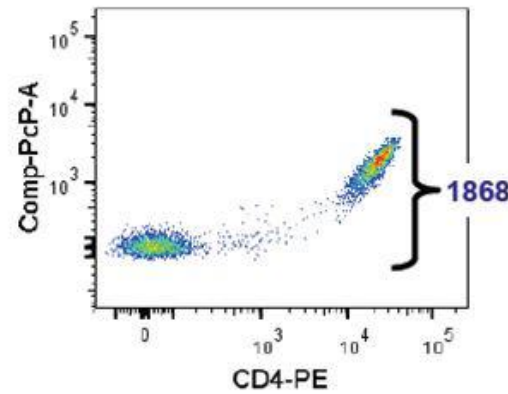


Kompenzace

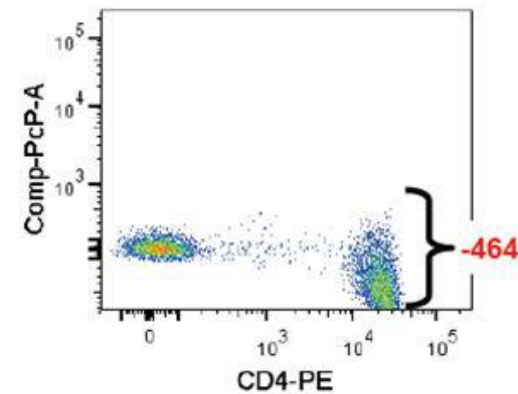
Přesvit je třeba „kompenzovat“, tak aby detektor zaznamenal signál pouze jednoho fluorochromu



Properly compensated



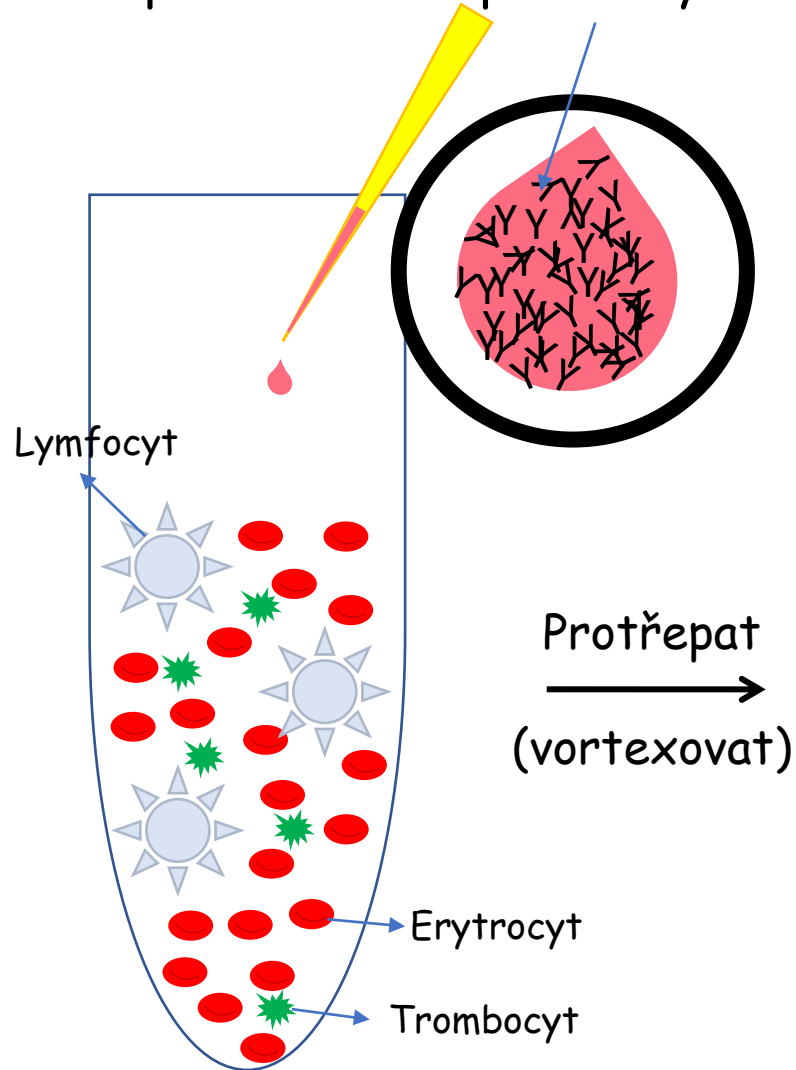
Under compensated



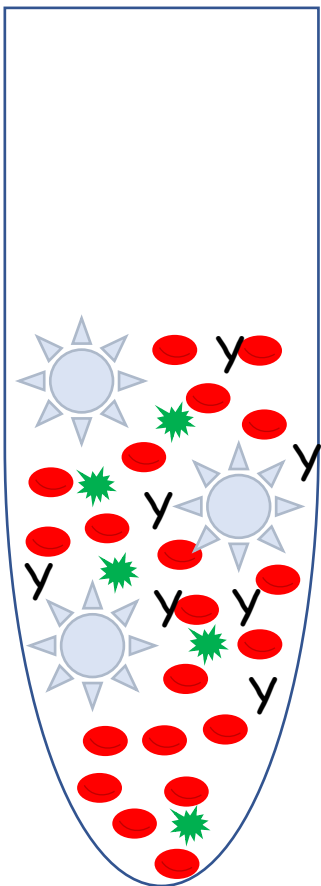
Over compensated

Příprava vzorku

Pipetovat MIX potřebných MPL

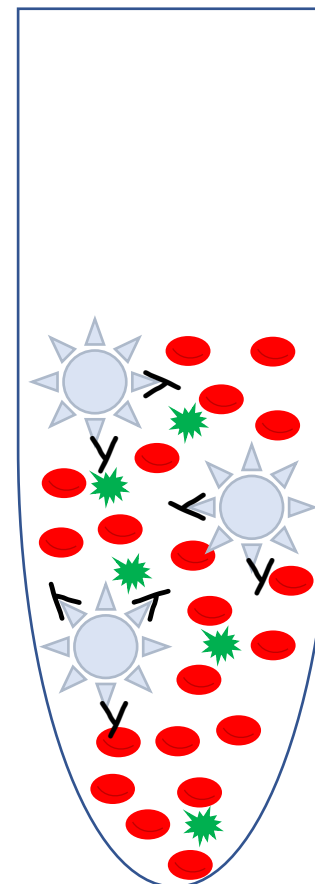


Volné MPL - vazba na receptory



30min.
inkubace
→
tma
lab. teplota

Plná krev značená MPL



Vzorek krve 45μl

Vzorek krve 45μl + MPL

Lýza erytrocytů

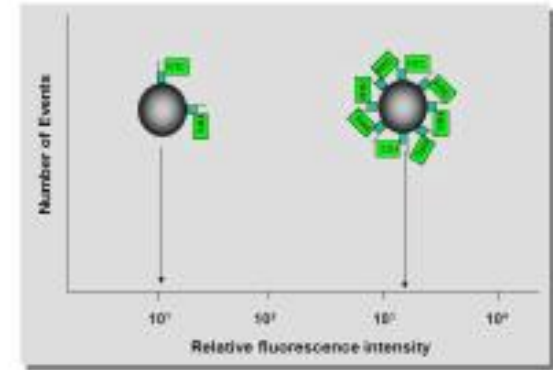
- Erytrocyty přítomné ve vzorku zahlcují cytometr proto po značení plné krve MPL je nutné erytrocyty lyzovat
- Ke vzorku se postupně přidává:
 - **Roztok A: 600ul**
 - Příprava roztoku A: 1,5 l destilované vody + 1,8 ml 99% kyselina mravenčí - způsobuje lýzu erytrocytů v kyselém prostředí
 - **Roztok B: 300ul**
 - Příprava roztoku B: 1,5 l destilované vody + 9,0 g bezvodého Na_2CO_3 , 21,75 g NaCl , 46,95 g bezvodého Na_2SO_4 - alkalický roztok = zastavení lýzy a úprava pH
 - **Roztok C: 100ul**
 - Příprava roztoku C.: 1,5 l PBS (pH 7-7,4) + 15 g paraformaldehydu - fixace buněk

Vzorky se do začátku měření uchovávají ve tmě při 4°C

Automatický lyzátor TQ-prep od firmy Beckman Coulter používaný na lýzu erytrocytů

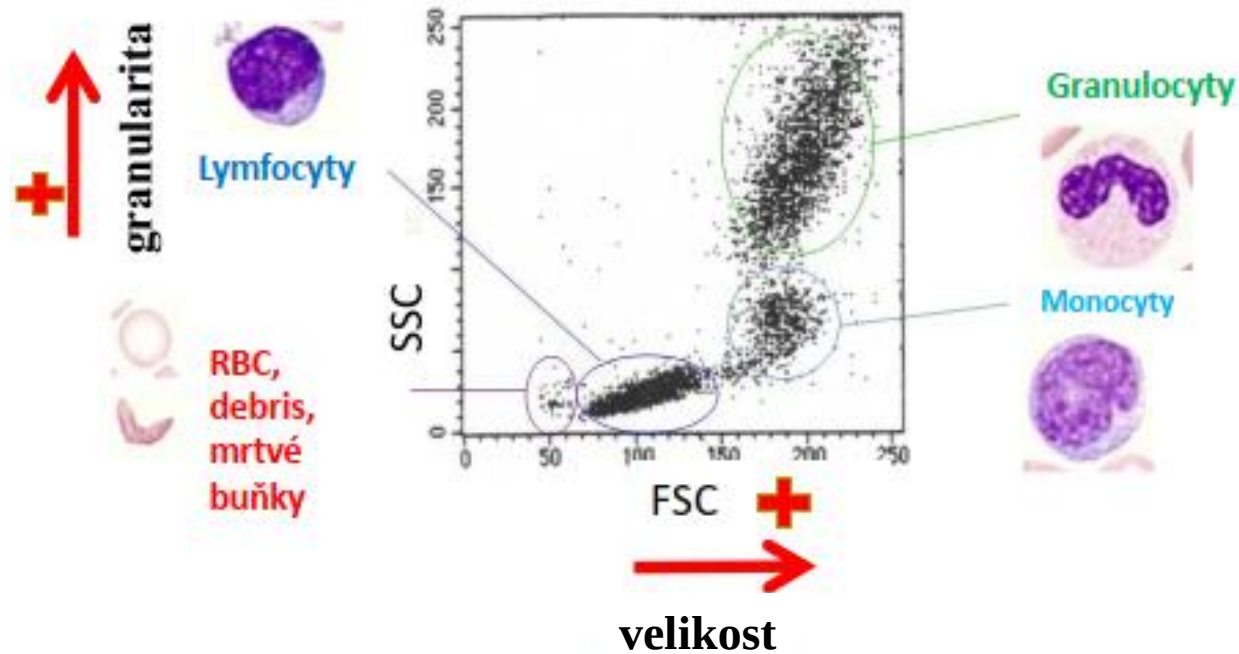


2 typy grafů



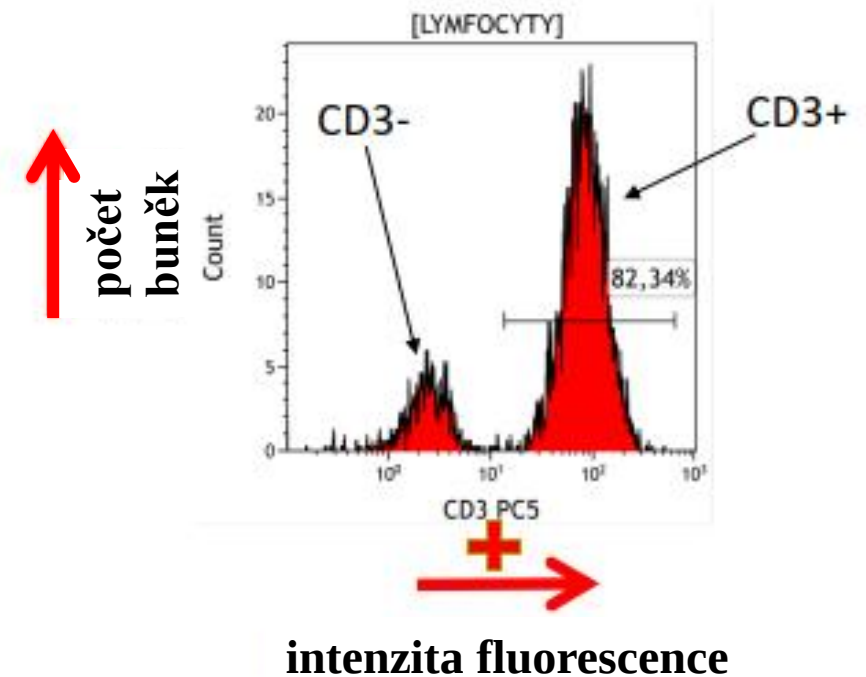
Dot plot

Volíme 2 libovolné parametry vůči sobě
(osa x a osa y)



Histogram

Volíme 1 vybraný parametr (osa x), na ose y
je vždy parametr count (= počet buněk)

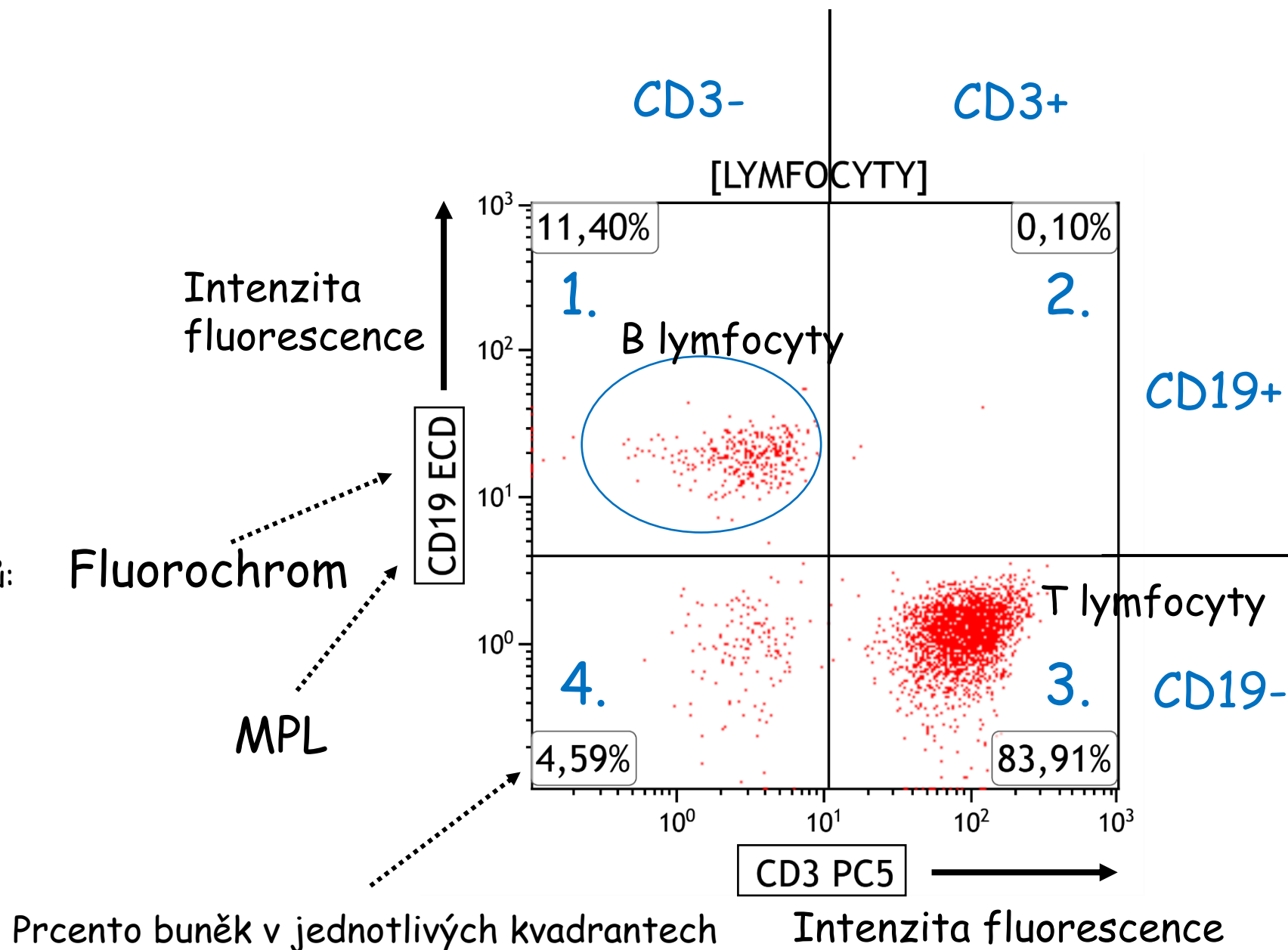


DOT PLOT

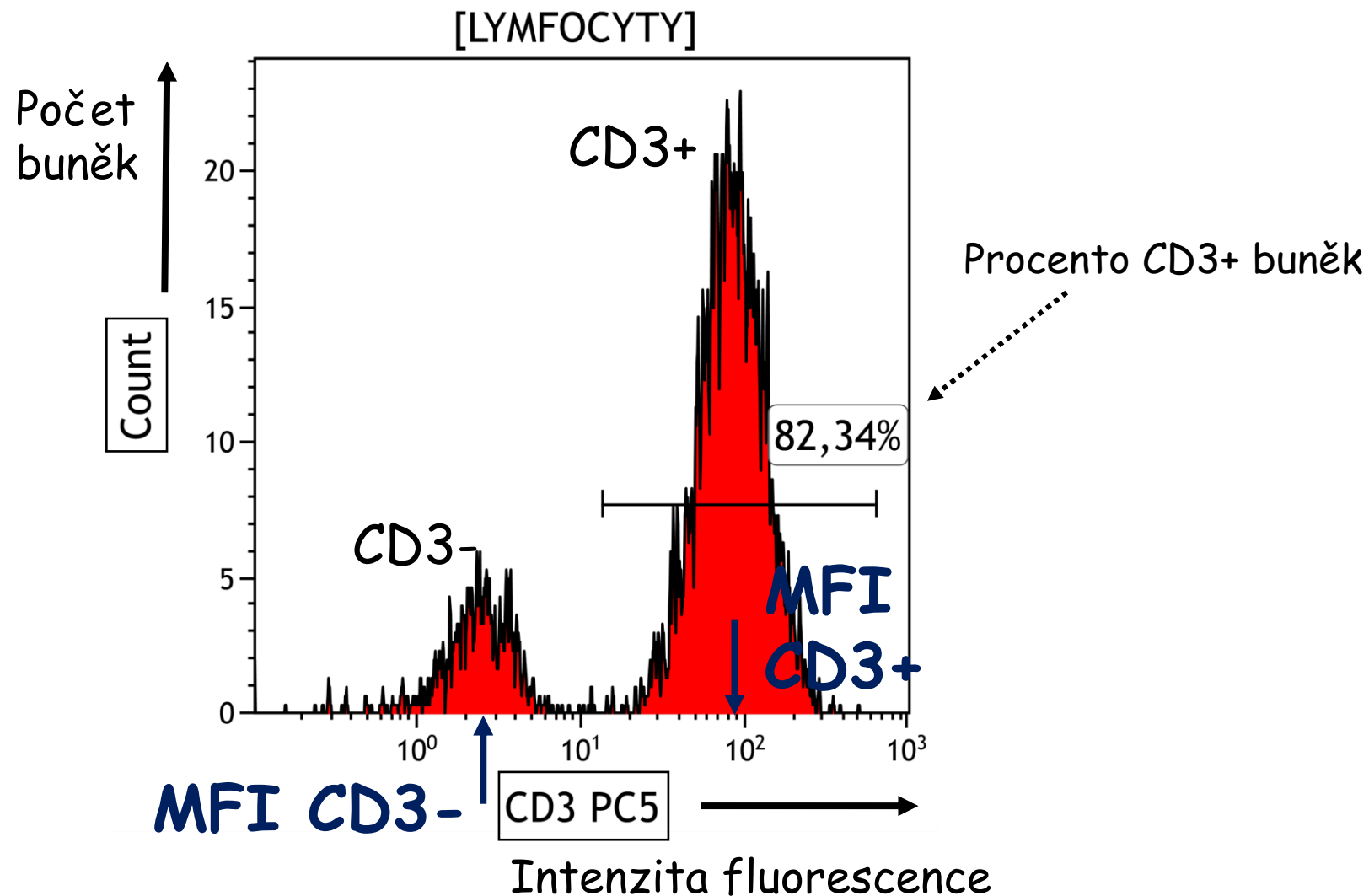
- každá tečka zobrazuje 1 buňku a vyjadřuje expresi daného znaku na buňce
- v jednotlivých kvadrantech se nachází buňky s podobnou expresí sledovaných znaků

Dot Plot rozdělený do 4 kvadrantů na základě exprese sledovaných znaků:

1. CD19+ CD3- = B lymfocyty (11,40% z lymfocytů)
2. CD19+ CD3+
3. CD19- CD3+ = T lymfocyty (83,91% z lymfocytů)
4. CD19- CD3-



HISTOGRAM



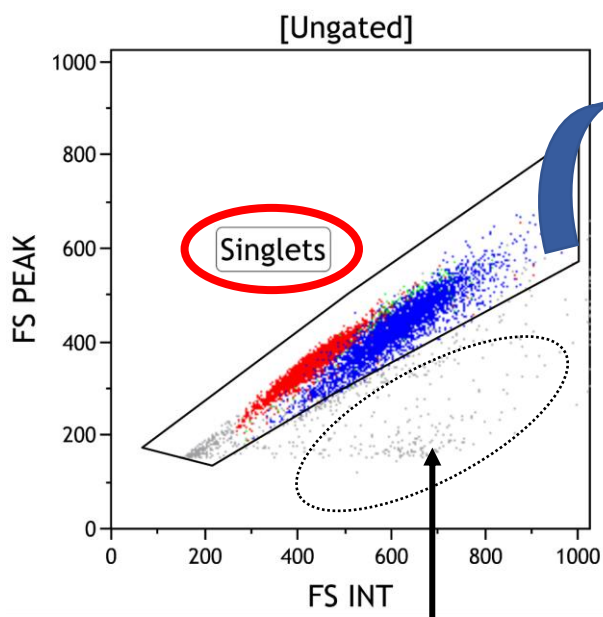
Kromě procentuálního zastoupení můžeme na histogramu sledovat i mean (medián) fluorescence MFI (MdFI)

Analýza naměřených dat – Gating Strategy

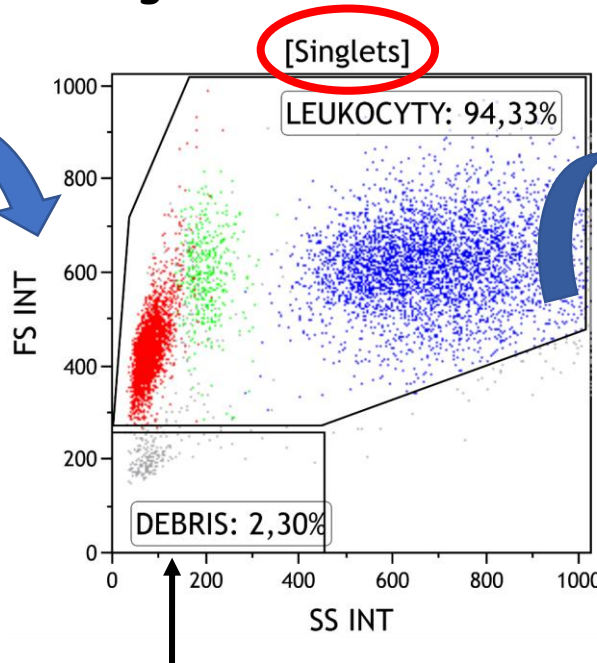
Gatovací strategie: postupný výběr buněk

Naměřené vzorky obsahují, kromě různých typů buněk, také slepené buňky, mrtvé buňky anebo prachové částice. Gatovací strategie slouží k odfiltrování nechtěných částic z analýzy a k výběru cílové populace buněk na základě různé kombinace použitých znaků. V grafu se následně ohraničí jen buňky, které nás zajímají (vytvoří se tzv. gate). Další graf už zobrazuje jen buňky výběru (ohraničené) z předcházejícího grafu.

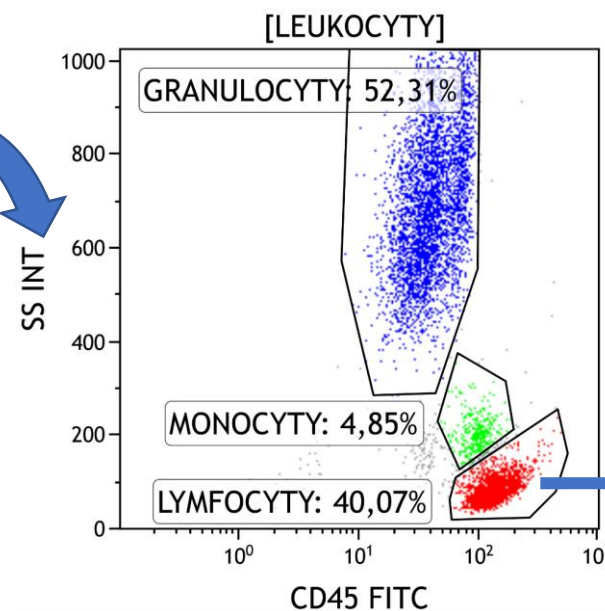
Název gate, z kterého se zobrazují buňky



Oddělení doubletu - slepených buněk



Mrtvé buňky a prachové částice



Další analýza

Krevní diferenciál

Základní vyšetření v imunologické laboratoři FNUSA: *stanovení zastoupení lymfocytárních subpopulací v plné krvi*

Průtokovou cytometrií se stanovuje počet buněk v jednotlivých subpopulacích lymfocytů a porovnává se s referenčními hodnotami.

Připravují se **dvě zkumavky** s následující kombinací monoklonálních protilátek MPL:

MPL + Fluorochrom

Zkumavka A: 45μl krve + x μl MPL

CD45	FITC
CD3	PC5
CD4	RD-1
CD8	ECD

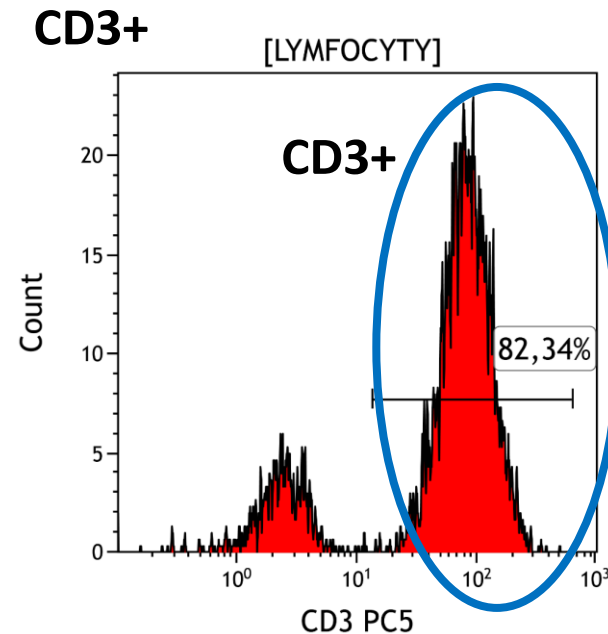
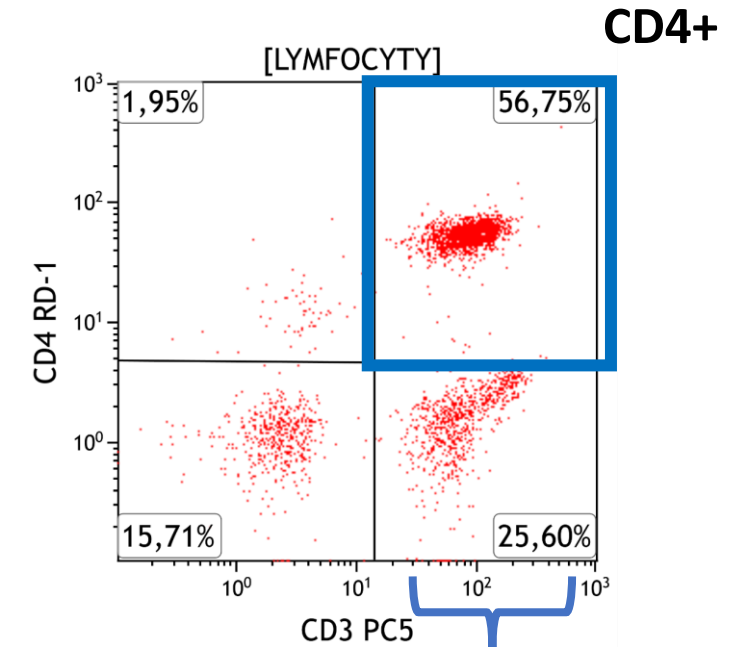
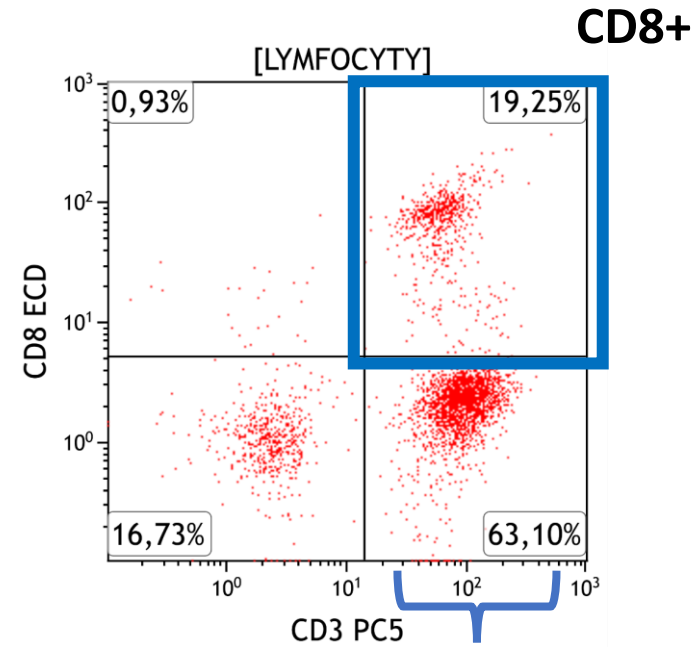
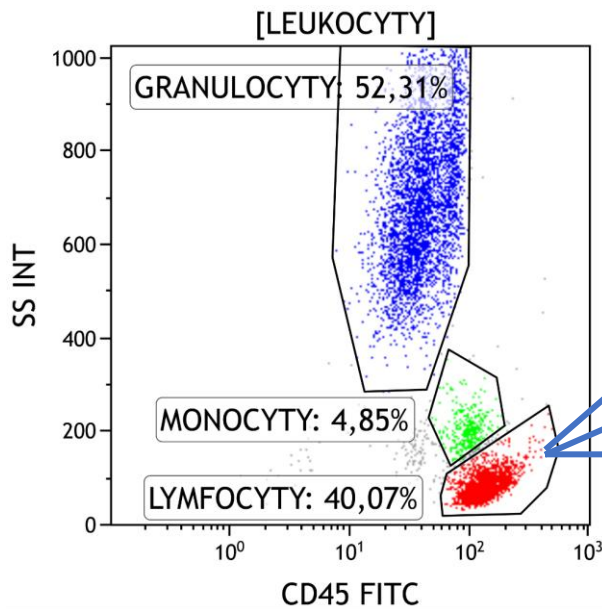
Zkumavka B: 45μl krve + x μl MPL

CD45	FITC
CD3	PC5
CD19	ECD
CD16/56	RD-1

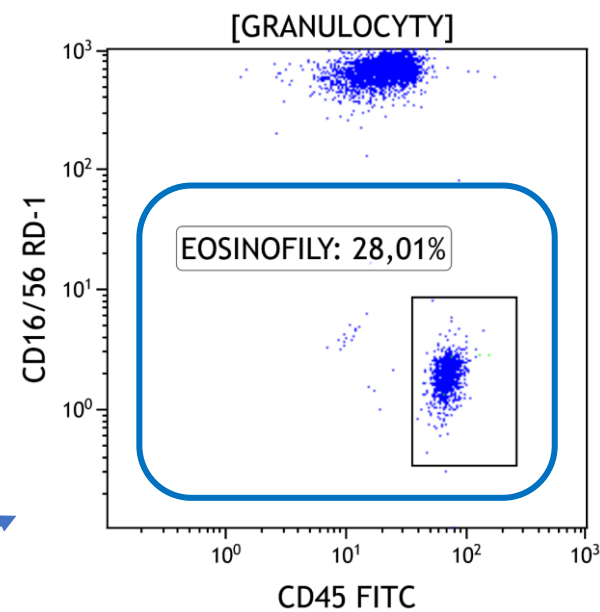
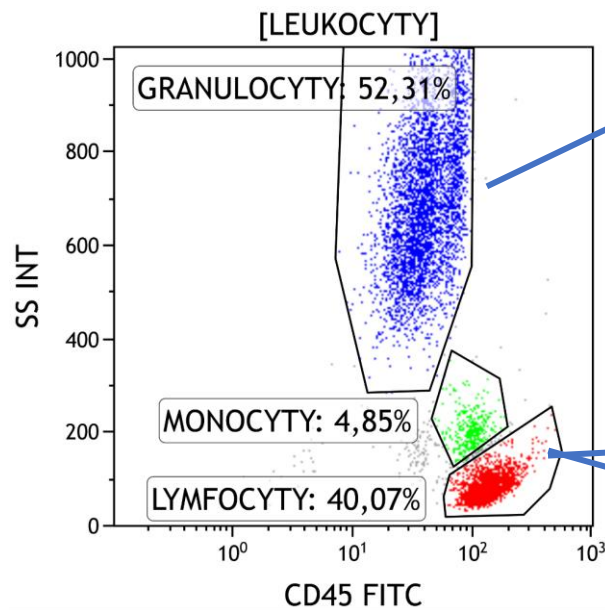
Vzorky krve s MPL se inkubují 30 min, následuje lýza erytrocytů a měření na průtokovém cytometru

Krevní diferenciál - gatovací strategie

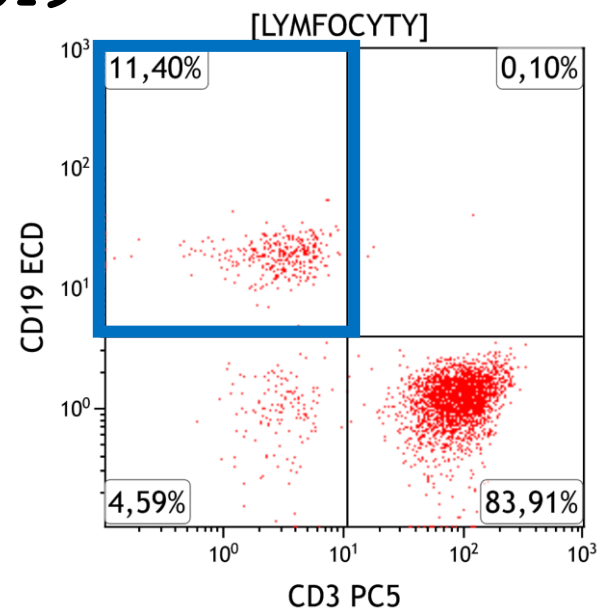
Zkumavka A:



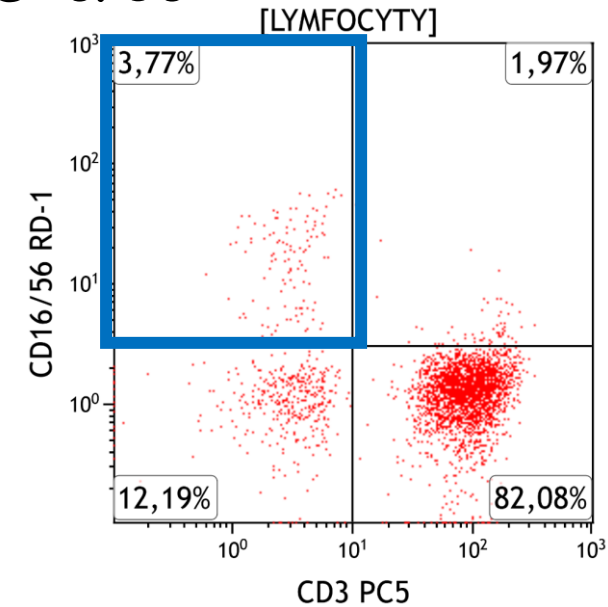
Zkumavka B:



CD19+

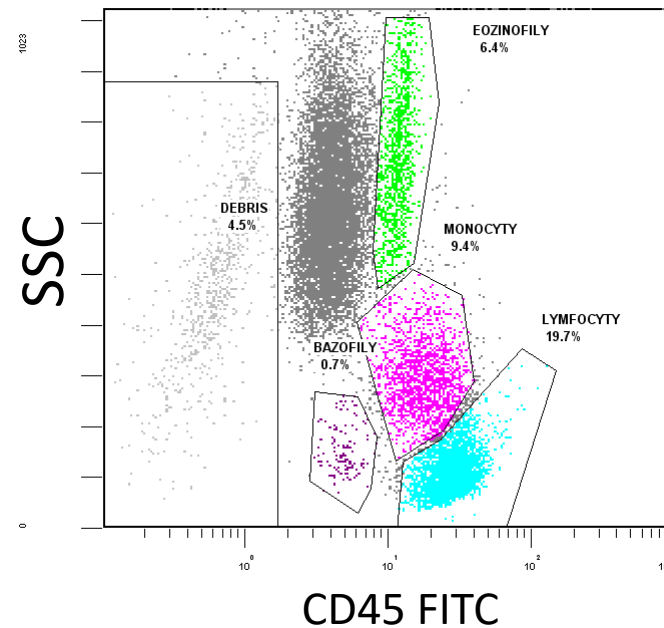
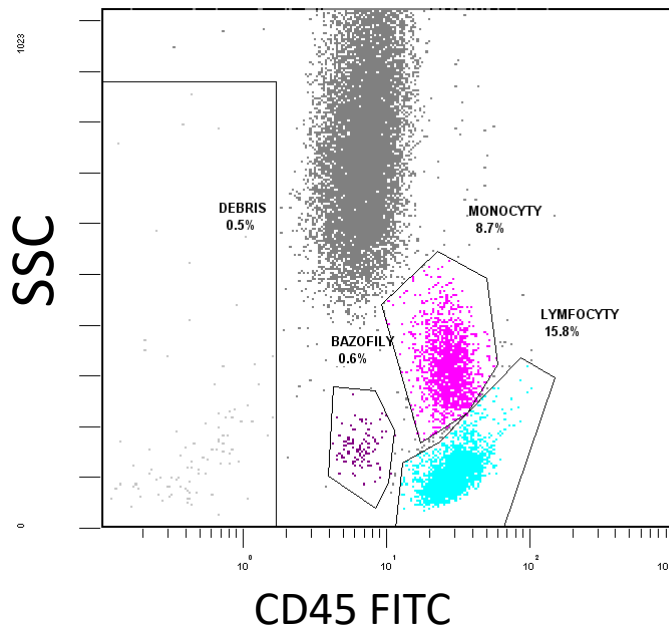


CD16/56+



Diferenciální rozpočet

Stanovení relativního počtu leukocytárních a lymfocytárních subpopulací pomocí průtokové cytometrie



% Lymfocyty + % Monocyty + % Granulocyty
= 100 % = Leukocyty

% T-lym. + % B-lym + % NK buněk
= 100 % = Lymfocyty

%CD4 + %CD8 odpovídá přibližně % celkových T lymf.

CD45- panleukocytární znak, přítomný na všech leukocytech

Stanovení absolutního počtu lymfocytárních subpopulací

!Absolutní počet leukocytů

lymfocyty

3,6-10 $\times 10^9/l$

monocyty

20-55 %

0-10 %

granulocyty - neutrofily, eosinofily, bazofily

37-75 %

Příklad:

Leukocyty 5 $\times 10^9/l$

relativní počet

Lymfocyty: 20%

abs. počet

1,0 $\times 10^9/l$

CD3: 75%

0,75 $\times 10^9/l$

CD19: 10%

0,1 $\times 10^9/l$

CD16,56: 15%

0,15 $\times 10^9/l$

Vyšetrenie lymfocytov periférnej krvi

ZNAK	EXPRESIE	FUNKCE	ZASTOUPENÍ NA LYMFOCYTECH PERIFERNÍ KRVĚ (%)
CD3	všetchny T-lymfocyty	asociován s TCR, přenos signálu	58-85
CD4	pomocné T-lymfocyty	receptor pro MHC II, aktivace	30-60
CD8	cytotoxické T-lymfocyty	receptor pro MHC I, aktivace	15-35
CD19	B-lymfocyty	regulátor aktivace	7-23
CD16/CD56	NK-buňky	FcR pro IgG/mediátor adheze	6-20
HLA-DR	B-lymfocyty, monocyty, aktivované T-lymfocyty	MHC II, prezentace Ag	B-lymfocyty konstitutivně (na všech B-lymfocytech), T-lymfocyty 3-7 (na aktivovaných T-lymfocytech)

Věková závislost zastoupení lymfocytárních subpopulací

Table 1. Relative size of lymphocyte subpopulations in blood

Lymphocyte subpopulations	Age groups									
	Neonatal (n = 20)	1 wk-2 mo (n = 13)	2-5 mo (n = 46)	5-9 mo (n = 105)	9-15 mo (n = 70)	15-24 mo (n = 33)	2-5 yr (n = 33)	5-10 yr (n = 35)	10-16 yr (n = 23)	Adults (n = 51)
CD19 ⁺ B lymphocytes	12% (5-22)	15% (4-26)	24% (14-39)	21% (13-35)	25% (15-39)	28% (17-41)	24% (14-44)	18% (10-31)	16% (8-24)	12% (6-19)
CD3 ⁺ T lymphocytes	62% (28-76)	72% (60-85)	63% (48-75)	66% (50-77)	65% (54-76)	64% (39-73)	64% (43-76)	69% (55-78)	67% (52-78)	72% (55-83)
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ T lymphocytes	41% (17-52)	55% (41-68)	45% (33-58)	45% (33-58)	44% (31-54)	41% (25-50)	37% (23-48)	35% (27-53)	39% (25-48)	44% (28-57)
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ T lymphocytes	24% (10-41)	16% (9-23)	17% (11-25)	18% (13-26)	18% (12-28)	20% (11-32)	24% (14-33)	28% (19-34)	23% (9-35)	24% (10-39)
CD4/CD8 ratio per CD3 ⁺	1.8 (1.0-2.6)	3.8 (1.3-6.3)	2.7 (1.7-3.9)	2.5 (1.6-3.8)	2.4 (1.3-3.9)	1.9 (0.9-3.7)	1.6 (0.9-2.9)	1.2 (0.9-2.6)	1.7 (0.9-3.4)	1.9 (1.0-3.6)
CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺ T lymphocytes	2% (1-6)	5% (1-38)	3% (1-9)	3% (1-7)	4% (2-8)	6% (3-12)	6% (3-13)	7% (3-14)	4% (1-8)	5% (2-12)
CD3 ⁺ /CD16-56 ⁺ NK cells	20% (6-58)	8% (3-23)	6% (2-14)	5% (2-13)	7% (3-17)	8% (3-16)	10% (4-23)	12% (4-26)	15% (6-27)	13% (7-31)

The relative frequencies are expressed within the lymphocyte population; median and percentiles (5th to 95th percentiles).

Hodnotenie nálezu jednotlivých subpopulácií

Snížení/ zvýšení	subpopulace	onemocnění
↓	CD19+, CD3+, CD4+, CD8+	při imunosupresi – např. cyklosporin (způsobuje lymfopenii)
↓	CD19+	u některých pacientů s CVID
↑	CD19+	B – buněčná leukémie
↓	CD3+	při expozici člověka toxickými chemikáliemi
↑	CD3+	T – buněčná leukémie
↓	CD4+	u některých pacientů s CVID (běžný variabilní imunodeficit – <u>c</u> ommon <u>v</u> ariable <u>i</u> mmunode <u>f</u> iciency) - virové infekce (EBV, CMV, HIV)
↑	CD4+	autoimunity, alergie
↓	CD8+	autoimunity (roztroušená skleróza, <u>s</u> ystémový <u>l</u> upus <u>e</u> rythematodes-SLE)
↑	CD8+	u některých pacientů s CVID - virové infekce (EBV, CMV, HIV)

Vliv infekce

Bakteriální infekce

- | | | | | |
|--------------------|---|-----------|----------------|---|
| • Počet leukocytů: | ↑ | Th: | CD3+ 4+: | ↑ |
| • Lymfocyty: | ↓ | Monocyty: | CD14+HLA DR+ : | ↓ |
| • Granulocyty: | ↑ | | | |

Virová infekce

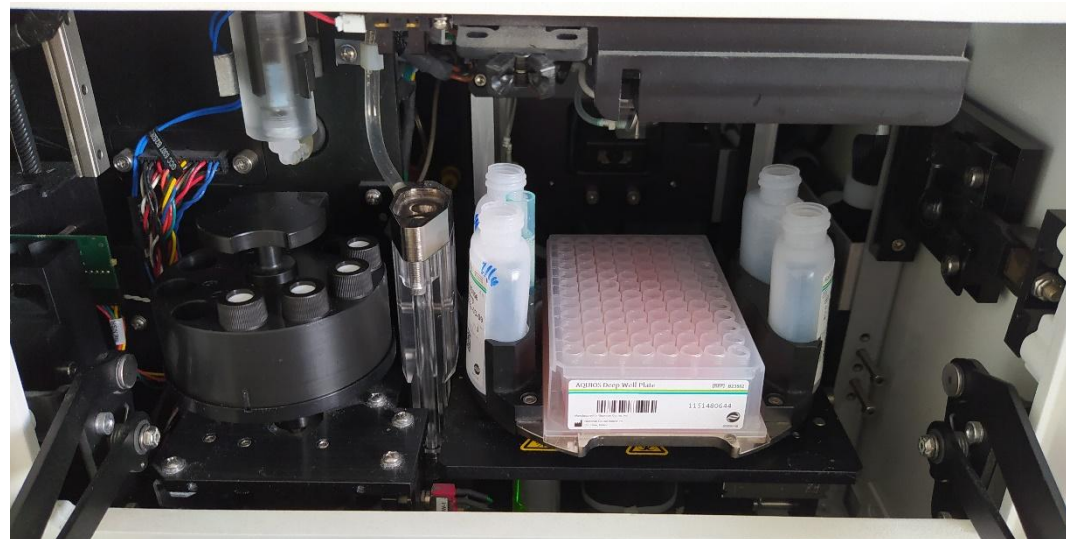
- | | | | | |
|--------------------|---|-----|-----------------|---|
| • Počet leukocytů: | ↓ | Tc: | CD3+ 8+: | ↑ |
| • Lymfocyty: | ↑ | | CD3+8+HLA DR+ : | ↑ |
| • Granulocyty: | ↓ | | CD3+8+38+ : | ↑ |

Aquios CL

- automaticky bez nutnosti jakýchkoliv manuálních intervencí zpracovává vzorek od vložení zkumavky až po vydání výsledků
- pracuje přímo s primárními zkumavkami v kazetách (stojáncích)
- čte čárový kód zkumavky
- následně propíchnutím septa aspiruje krev
- poté přidá protilátky, inkubuje
- napipetuje lyzační roztok
- změří vzorek

Výsledky jsou uloženy v software přístroje a automaticky nebo po jejich validaci obsluhou jsou odesílány do LIS

Aquios CL



Výhody a nevýhody průtokové cytometrie

Výhody

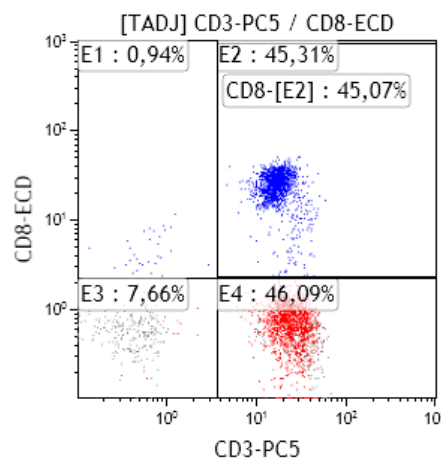
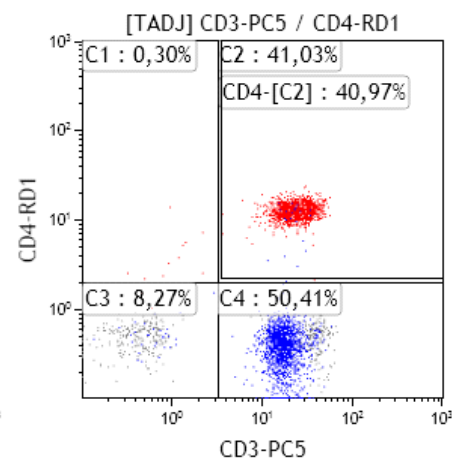
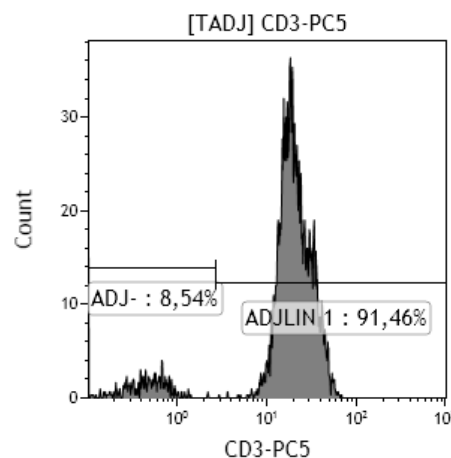
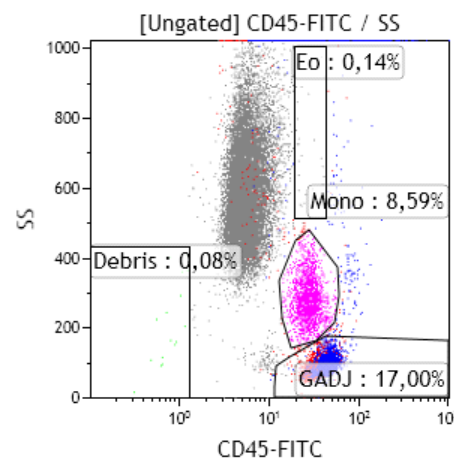
- Velké množství analyzovaného materiálu - velké množství dat
- Analýza trvá několik minut
- Kvalitativní + kvantitativní analýza
- Možné manipulační operace
např. třídění buněk podle vybraných vlastností (cell sorting)

Nevýhody

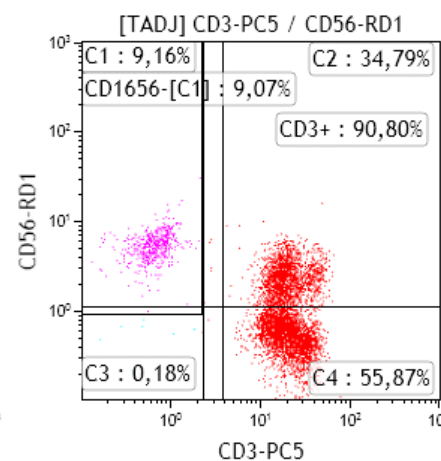
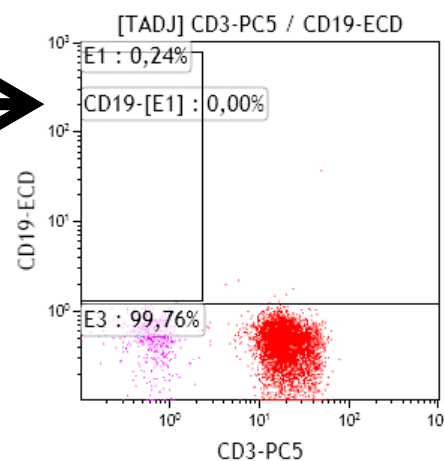
- Vysoká finanční náročnost
- Sestavení experimentu, analýza a vyhodnocení dat závislé na zkušenostech obsluhy
- Analýza vzorků co nejdříve po odběru
- Nevidíme lokalizaci signálu na buňce

Příklady využití v praxi

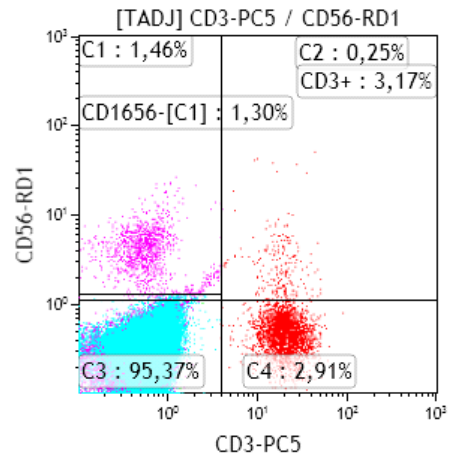
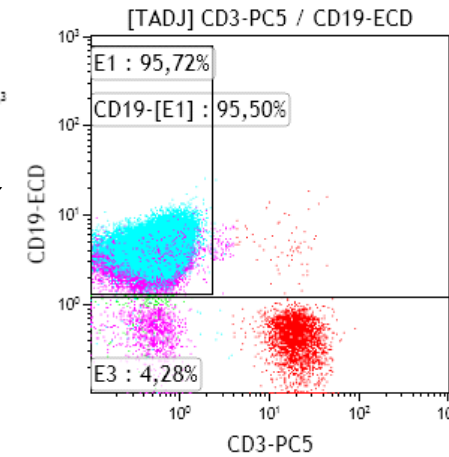
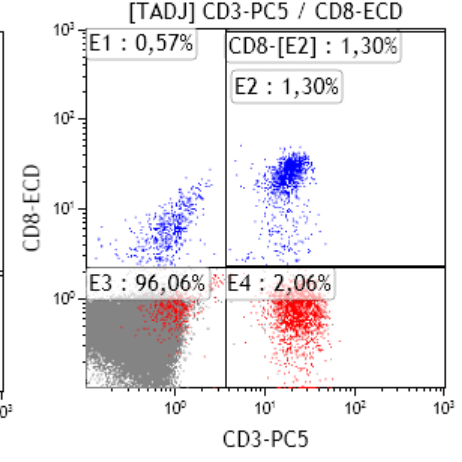
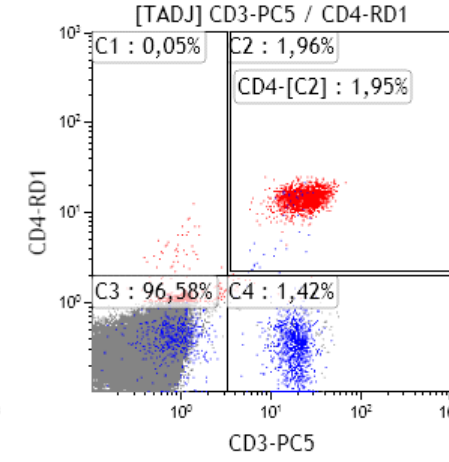
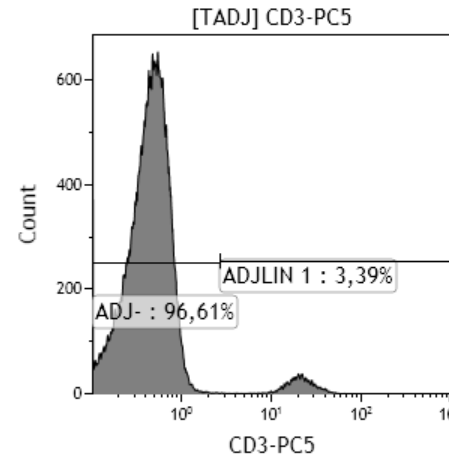
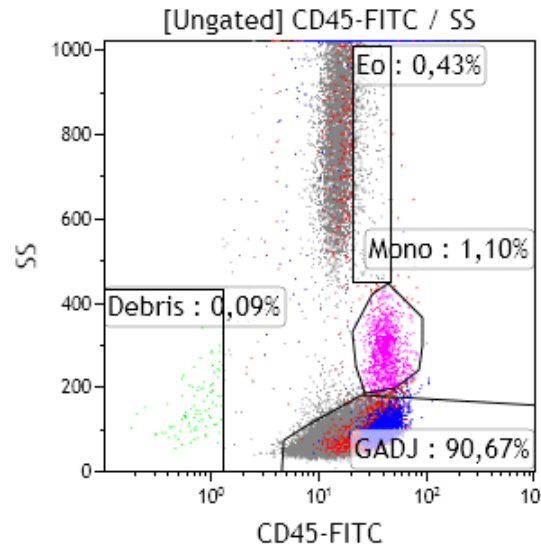
Pacientka: Ž,
*1957



- v krevním diferenciálu chybí B-lymfocyty (0,0 % z celkových lymfocytů)
- v nemocničním systému zjištěná léčba rituximabem - pacientka revmatologie
- výsledek: deplece B lymfocytů vlivem léčby (po 4-6 měsících návrat k normálním hodnotám)



Pacient: M,
*1966

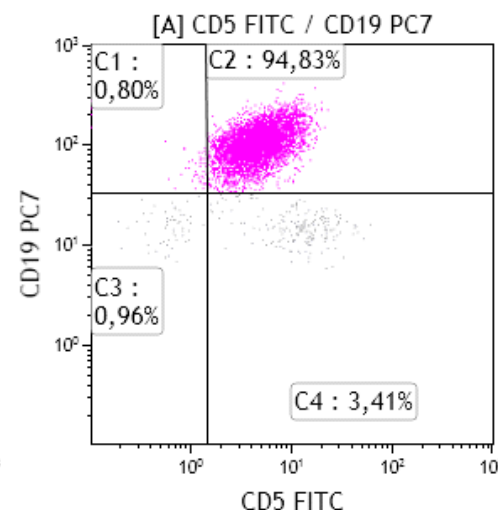
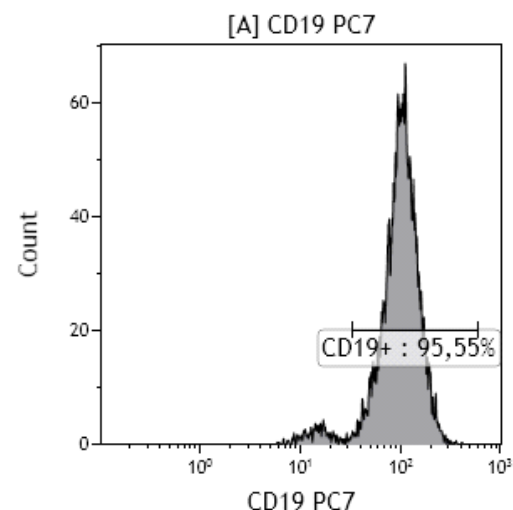
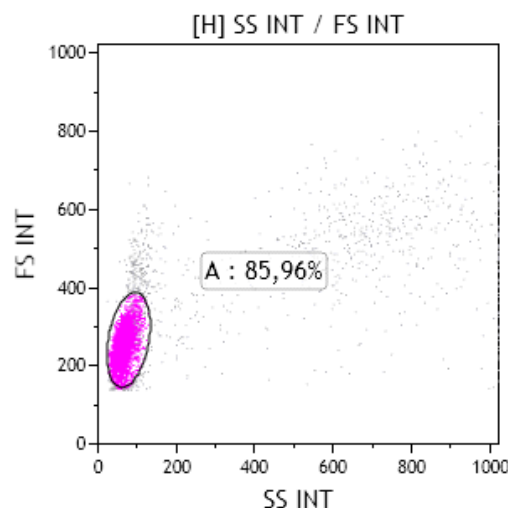


- v krevním diferenciálu vysoké hodnoty B lymfocytů (95,50 % z celkových lymfocytů)
- prvozáchyť: bez historie v nemocničním systému
- výsledek: podezření na B-lymfocytární malignity (CLL)
- nutné doplnit vyšetření CD5+CD19+ buněk

Pacient: M, *1966

Doplnění vyšetření na přítomnost CD5+CD19+ buněk

- CD5+CD19+ buňky = marker chronické lymfoproliferativní choroby
- u zdravé osoby se znak CD5 vyskytuje na T lymfocytech, normální hodnoty CD5+ na B lymfocytech u zdravého dospělého člověka: do 10% ze všech B lymfocytů



CD5+CD19+ : 94.8%

Vzorek: periferní krev odebraná do EDTA

Značení MPL:

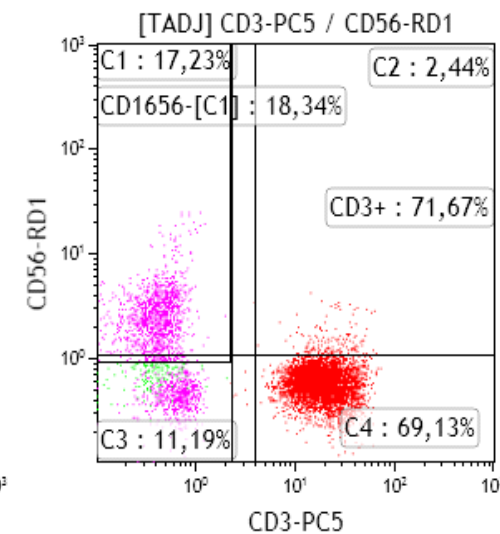
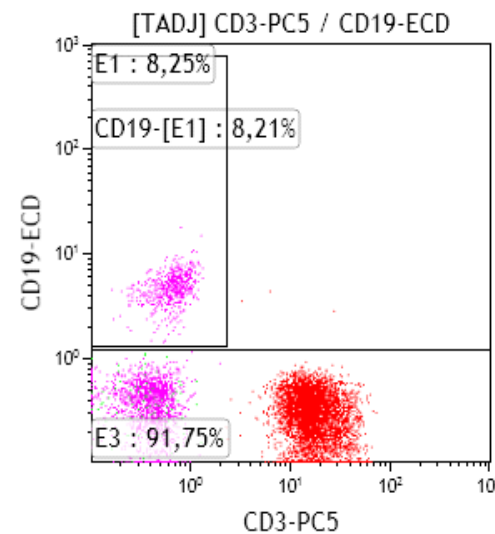
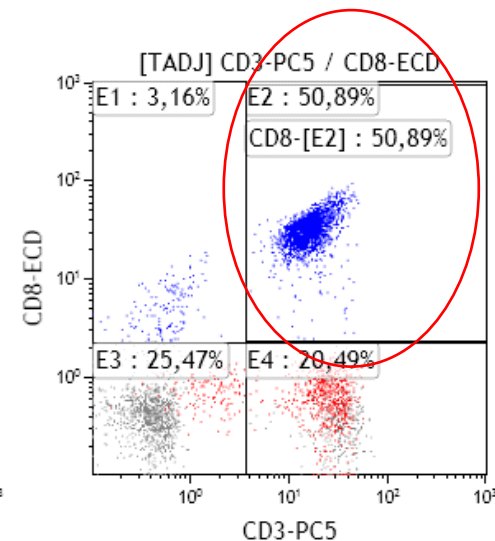
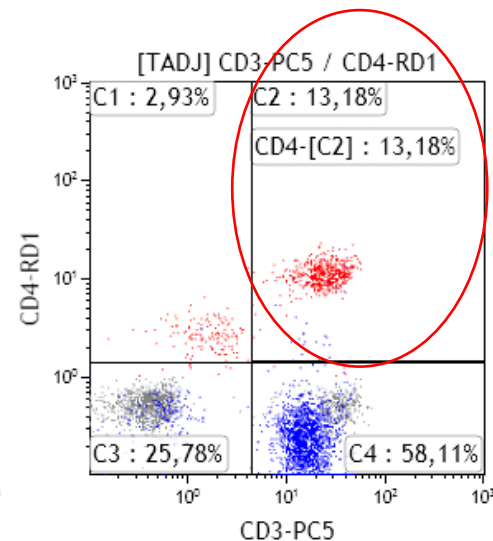
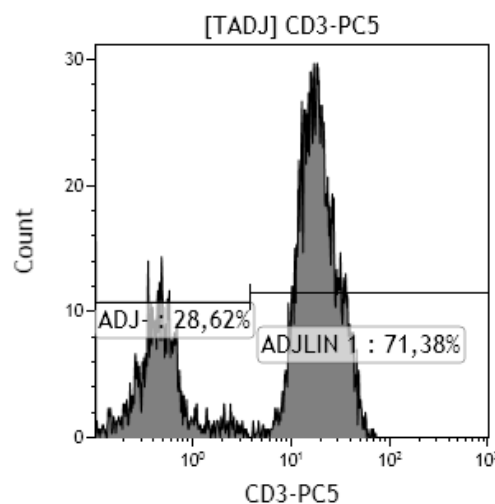
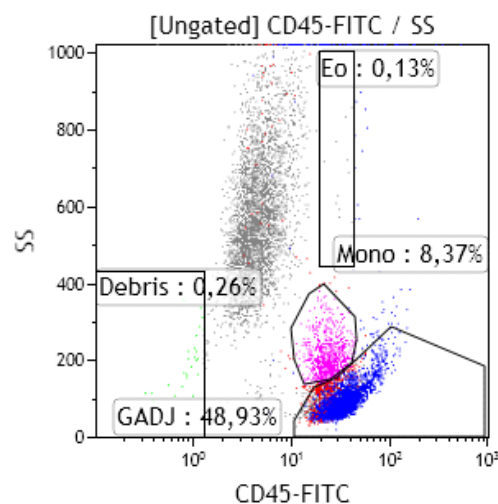
CD45 KO - panleukocytární znak

CD19 PC7- B lymfocyty

CD5 FITC

Výsledek: vysoký počet CD5+CD19+ = doporučení
na hematologické vyšetření

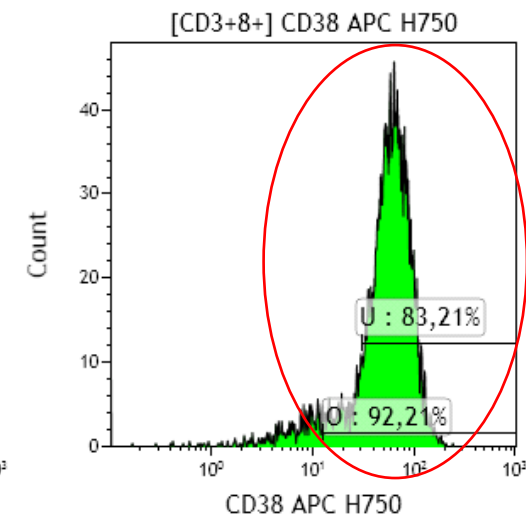
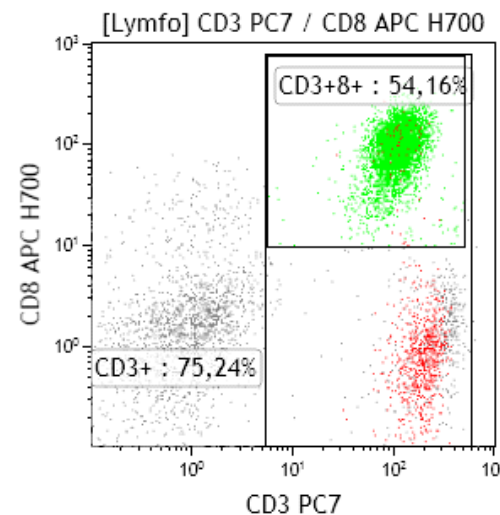
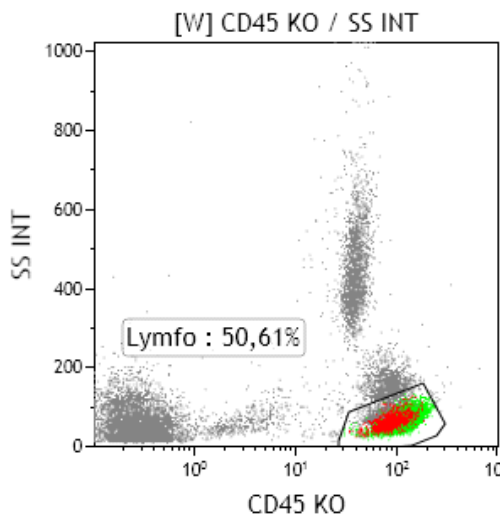
Pacient: M, *1999



- v krevním diferenciálu zjištěný obrácený poměr
CD3+CD4+ k CD3+CD8+ (13,2 : 50,9)
- fyziologické hodnoty: poměr CD3+CD4+ > CD3+CD8+
- prvozáchyt: bez historie v nemocničním systému
- výsledek: podezření na virovou infekci (často EBV, CMV)
- nutné doplnit vyšetření CD8+CD38+ buněk

Pacient: M, *1999

Doplnění vyšetření na
přítomnost zvýšené
exprese znaku CD38 na
CD3+CD8+ T lymfocytech

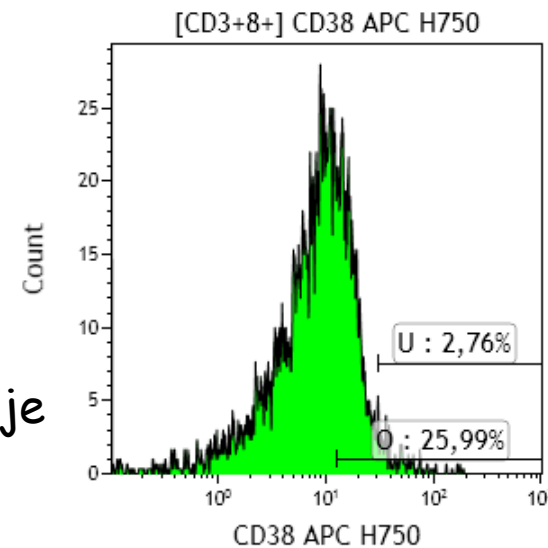


- CD8+CD38+ buňky = marker virových infekcí
- u zdravé osoby je zastoupení CD8+CD38+ T lymf. nízké, u virových infekcí se zvyšuje, patologické hodnoty = ???
- hodnoty vyšší než 50% CD8+CD38+ T lymf. z celkových CD3+CD8+ T lymf. nutné výsledek hlásit ošetřujícímu lékaři

CD8+CD38+ 83,2%
CD8++CD38++ 92,2%

Výsledek: vysoký počet CD8+CD38+ T-lymfocytů
= možná např. EBV infekce (mononukleóza),
doporučeno mikrobiologické vyšetření

Fyziologický obraz
Nastavení polohy gatí je
fixní- nastavené podle
zdravých kontrol

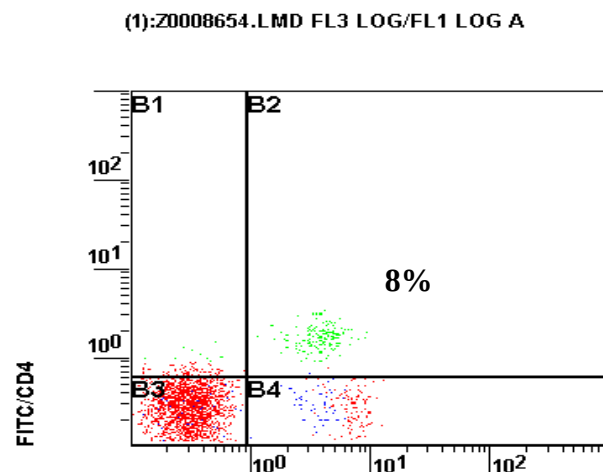


SCID - Severe Combined Immunodeficiency

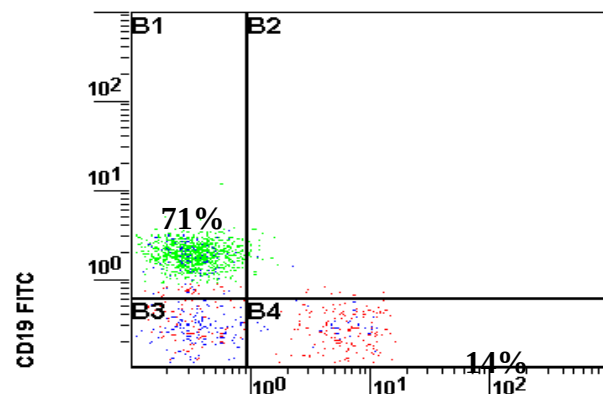
Těžký kombinovaný imunodeficiencit

- Primární imunodeficiency (vrozená), postižena je buněčná složka imunity
- Jedná o nejzávažnější vrozenou imunodeficienci (záhy po narození těžké infekce)
- Bez léčby (transplantace kostní dřeně) úmrtí v prvním roce života (vyvíjí se také genová terapie)
- Klinické projevy:
 - Infekce způsobené atypickými patogeny (pneumocysty, kandidózy, atypické mykobakteriózy, cytomegalová pneumotitida)
 - Chronické průjmy (bez průkazu etiologického agens), neprospívání, kožní infekce, komplikace po vakcinaci BCG
- Molekulární podstata je heterogenní, rozlišuje se několik skupin SCID:
 1. **SCID T-B+NK-**: Chybí T lymfocyty a NK buňky, B lymfocyty zachovány. **Nejčastější forma SCID** (60% všech případů). 70% případů vázáno na chromosom X - mutace genu pro gama řetězec receptoru pro IL-2. Tento gama řetězec je ale společný i receptorům pro IL-4, IL-7, IL-9 - funkční porucha mnoha cytokinů.
 2. **SCID T-B-NK+**: Absence T i B lymfocytů, NK buňky zachovány. Molekulární podstata heterogenní (některé případy deficit rekombinázy RAG-2, porucha exprese receptoru pro IL-7)
 3. **Porucha ADA (adenosindeaminázy)**: Dysfunkce nebo absence tohoto enzymu způsobuje akumulaci produktů metabolismu purinů, které jsou pro časně thymocyty toxické - rozvíjí se těžká T lymfopenie
 4. **Retikulární dysgeneze**: Postižení kmenové buňky, blokován vývoj myeloidní i lymfoidní linie.

SCID



(2):Z0008657.LMD FL3 LOG/FL1 LOG A



CD3 PERCP

Leu: $5,0 \times 10^9/l$

Ly: $4,0 \times 10^9/l$

T LYMFOCYTY

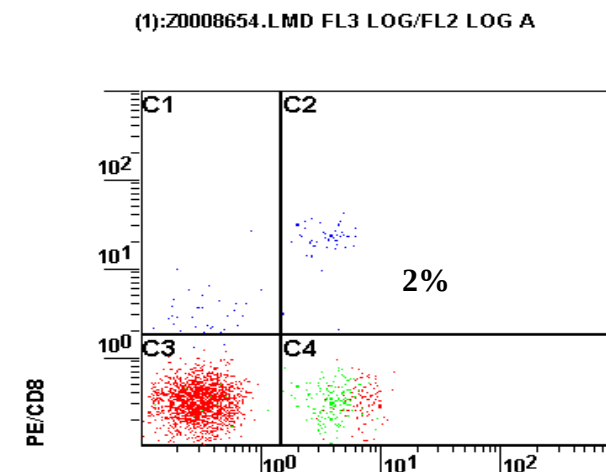
- CD3+: **14** (58-85)%
- CD3+4+: **8** (30-60)%
- CD3+8+: **2** (15-35)%

B LYMFOCYTY

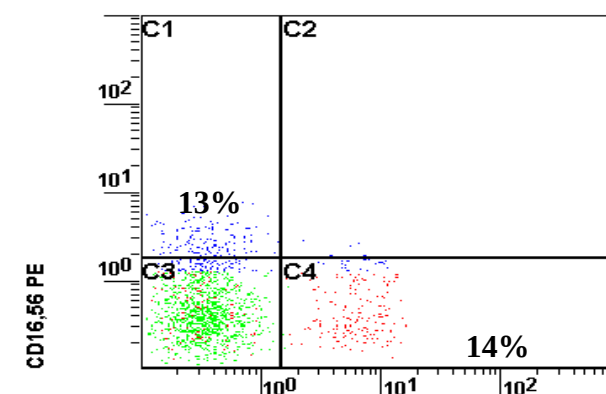
- CD19+: **71** (7-23) %

NK LYMFOCYTY

- CD16,56+: **13** (6-20)%



(2):Z0008657.LMD FL3 LOG/FL2 LOG A



CD3 PERCP

Výsledek: T-B+NK+ SCID

- všechny T-lymfocyty byly mateřské, aktivované, rozpoznávají HLA antigeny kojence jako „cizí“
- možné doplnit funkční test proliferace T-lymfocytů; dítě je směřované k transplantaci kostní dřeně

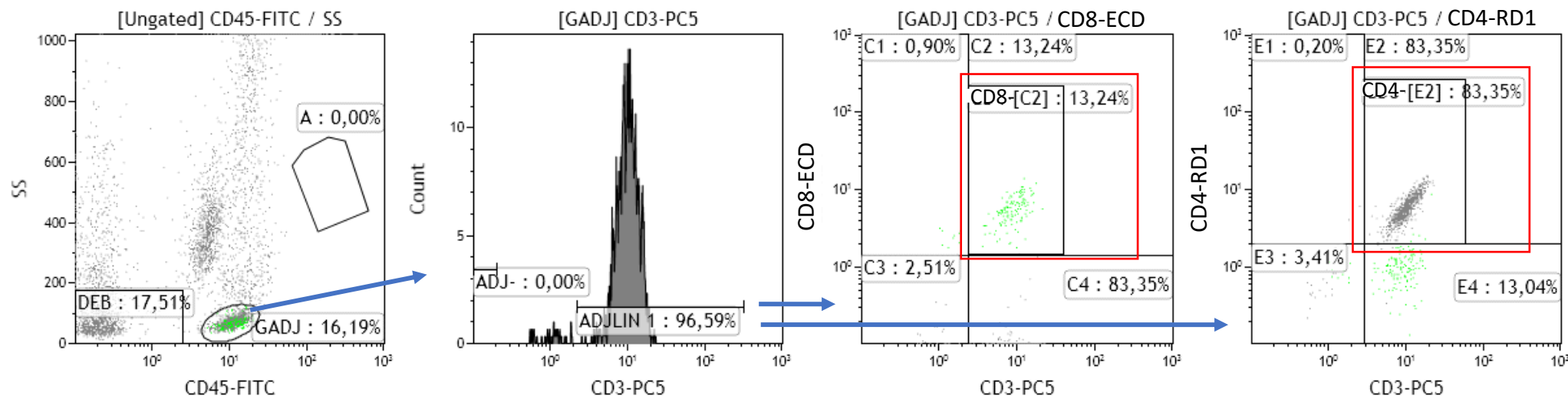
Bronchoalveolární laváž - BAL

- diagnostické bronchoskopické vyšetření
 - pacientovi se do bronchu (větve bronchu) pomocí fibrobronchoskopu aplikuje a následně zpět aspiruje 150-200 ml fyziologického roztoku
 - sleduje se procentuální zastoupení jednotlivých typů leukocytů
 - indikuje se u zánětlivých plicních onemocnění, nádorových onemocnění, intersticiálních plicních procesech, pneumokoniózách
-
- vzorek: bronchoalveolární tekutina
 - zpracování:
 - filtrace vzorku kvůli případnému obsahu nečistot, promytí, značení MPL:
 - CD45 FITC - panleukocytární znak
 - CD3 PC5 - T-lymfocyty
 - CD4 RD1 - Th- lymfocyty
 - CD8 ECD - Tc-lymfocyty

Pozn. Vzorek BAL nesmí obsahovat krev.

V krvi je jiné zastoupení lymfocytárních subpopulací než v BAL, v případě kontaminace BAL krví není možné rozpoznat, které lymfocyty pocházejí z krve a které z BAL, což vede ke zkresleným výsledkům.

Bronchoalveolární laváž - BAL



Diagnosticky důležitý je poměr CD3+**CD4+** k CD3+**CD8+** T-lymfocytů (= imunoregulační index)

Fyziologické hodnoty: poměr CD3+CD4+/CD3+CD8+ = 1,1 až 3,5

Patologické hodnoty:

- podezření např. na **sarkoidózu**, pneumónii, nádory dýchacích cest,...

HLA-B27

Znak HLA-B27 je asociovaný s řadou zánětlivých onemocnění jako zánět kloubů, vnitřních struktur oka (uveitida), krátkých kostí rukou, noh a šlach, dále psoriázou, chronickými bolestmi spodní části zad a spondyloarthropatiou - nejznámější je ankylózuující spondylitida (zánětlivé systémové onemocnění páteře a kloubů - **Bechtěrevova choroba**)

Vyšetření HLA-B27 není doplňujícím měřením ke krevnímu diferenciálu, je to samostatné měření

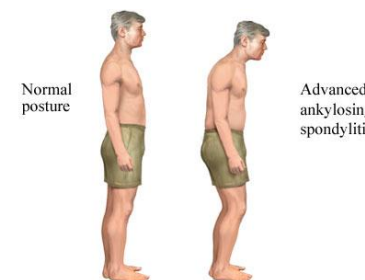
Vzorek: periferní krev odebraná do EDTA

Značení MPL:

CD3 PE- T-lymfocyty

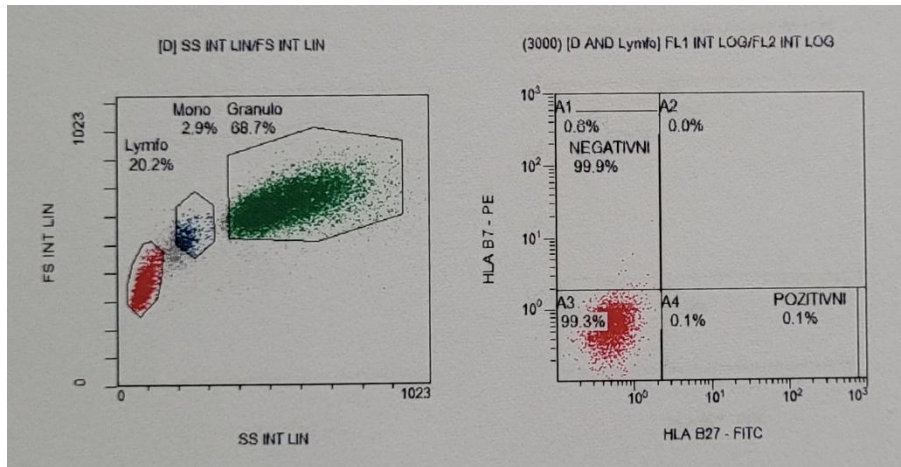
HLA-B27 FITC

Výsledek: cytometrické vyšetření HLA-B27 je jen **screeningová metoda**.
Pozitivní výsledek je třeba **konfirmovat** metodou PCR

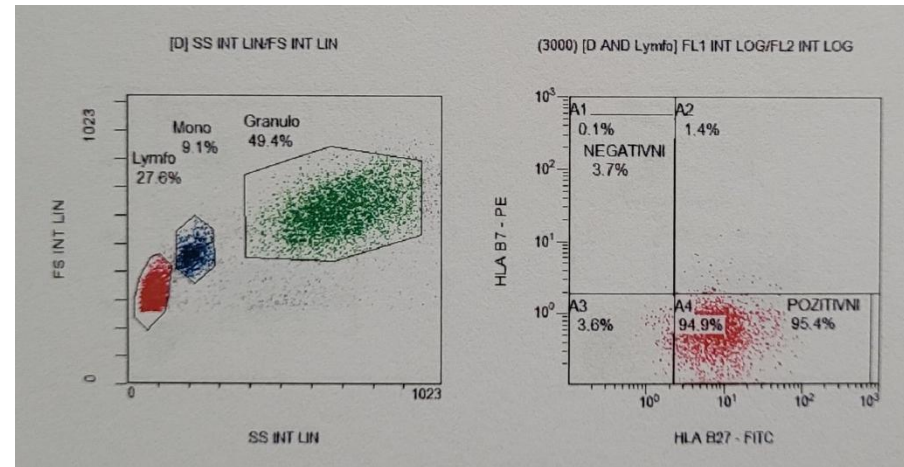


HLA-B27

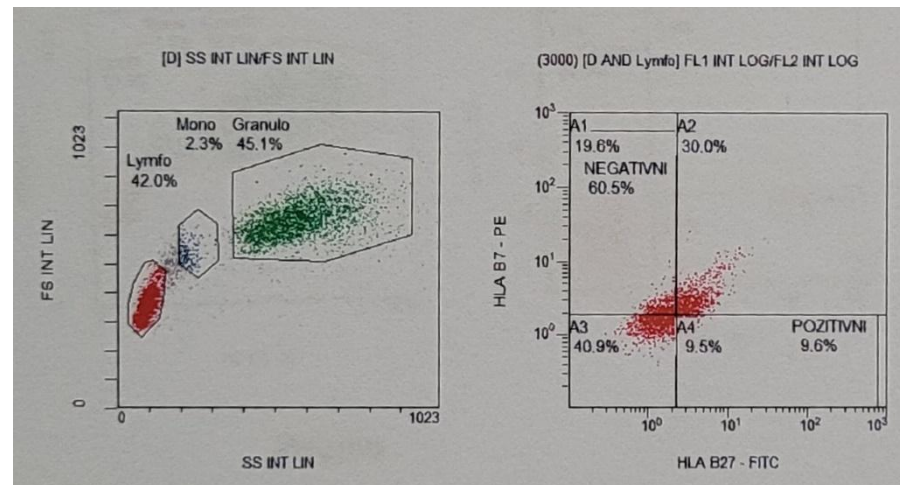
negativní



pozitivní



nelze určit

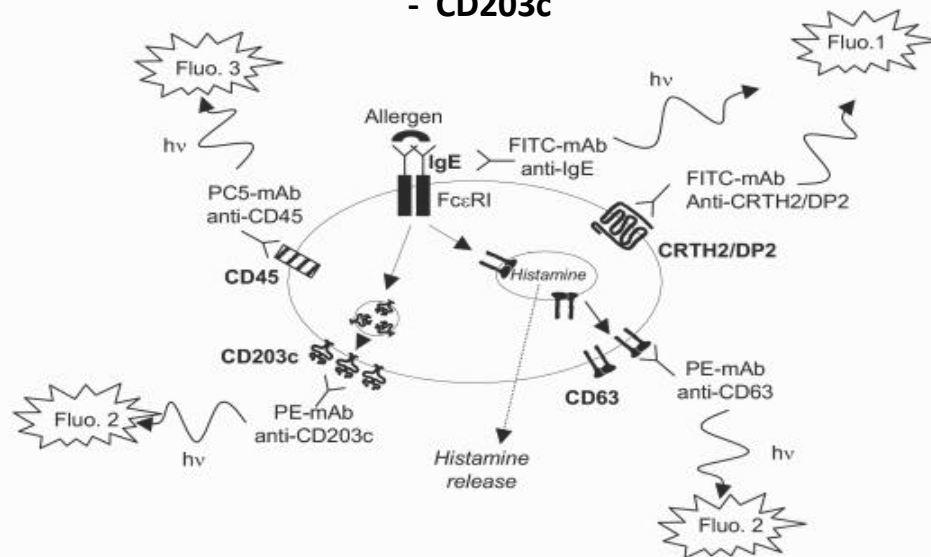


Využití průtokové cytometrie v alergologii

Test aktivace bazofilů (bazotest - BAT)

funkční test umožňující vyšetření aktivace bazofilů po setkání se s určitým alergenem *in vitro*

Na povrchu **bazofilů** - FcεRI (receptor pro **IgE**)
- **CD203c**

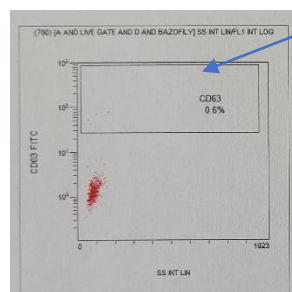
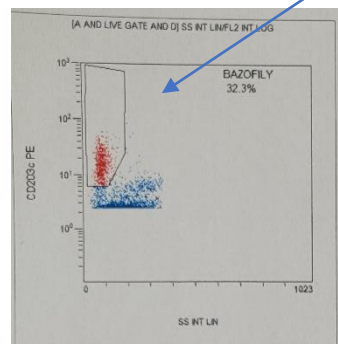


Založen na expresi aktivačního znaku (**CD63**) na povrchu periferních bazofilů po jejich expozici alergenem *in vitro*

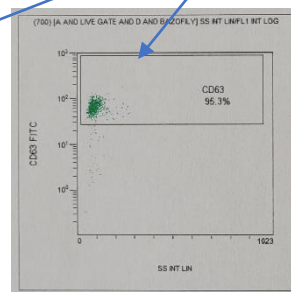
Reakce přecitlivělosti jsou podstatou alergických onemocnění. Reakce přecitlivělosti I. typu neboli **IgE mediovaná alergie** - je zprostředkována protilátkami IgE. IgE se naváže na bazofily ve fázi senzibilizace. Při dalším setkání s alergenem – alergen přemostí IgE, to vede k aktivaci bazofilů - masivnímu uvolnění produktů degranulace bazofilů a mastocytů → **zvýšená exprese CD63 a CD203c** na aktivovaných bazofilech.

ohraničíme **subpopulaci bazofilů** (CD203c pozitivní)

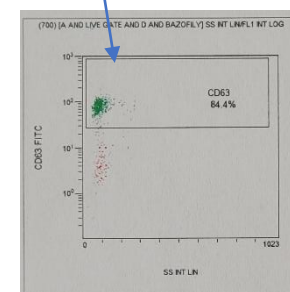
Sledujeme expresi **CD63** na povrchu bazofilů



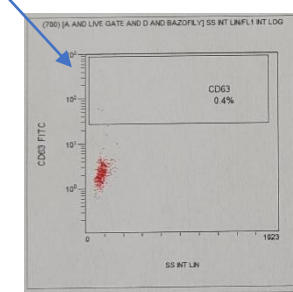
negativní kontrola



pozitivní kontrola

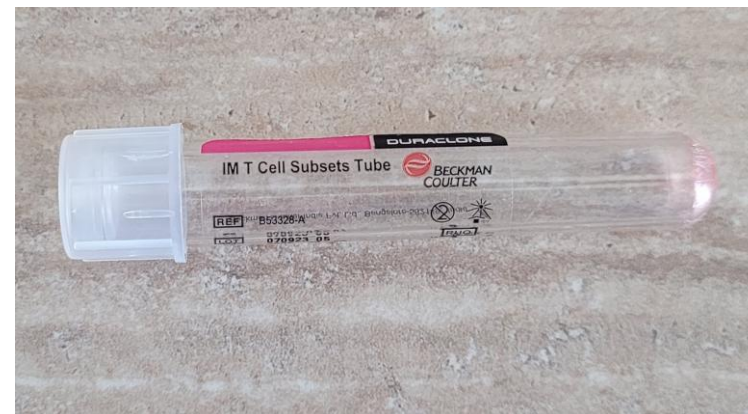


včela

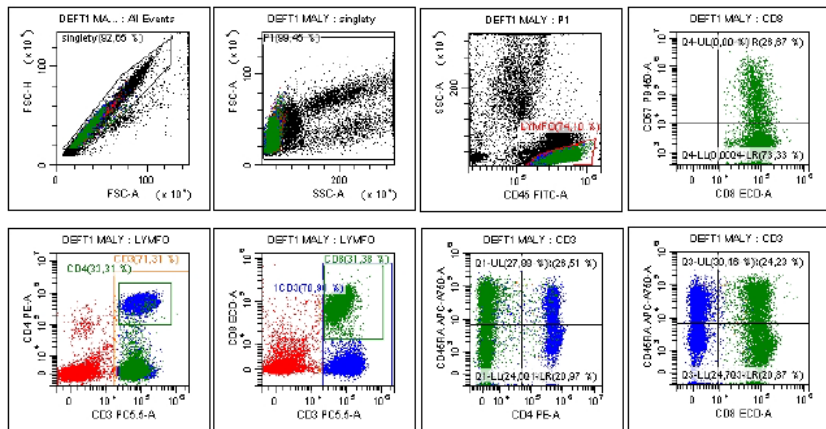


vosa

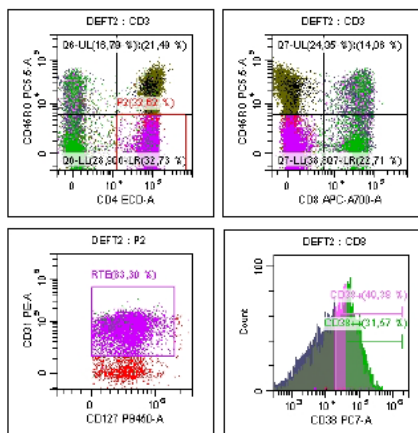
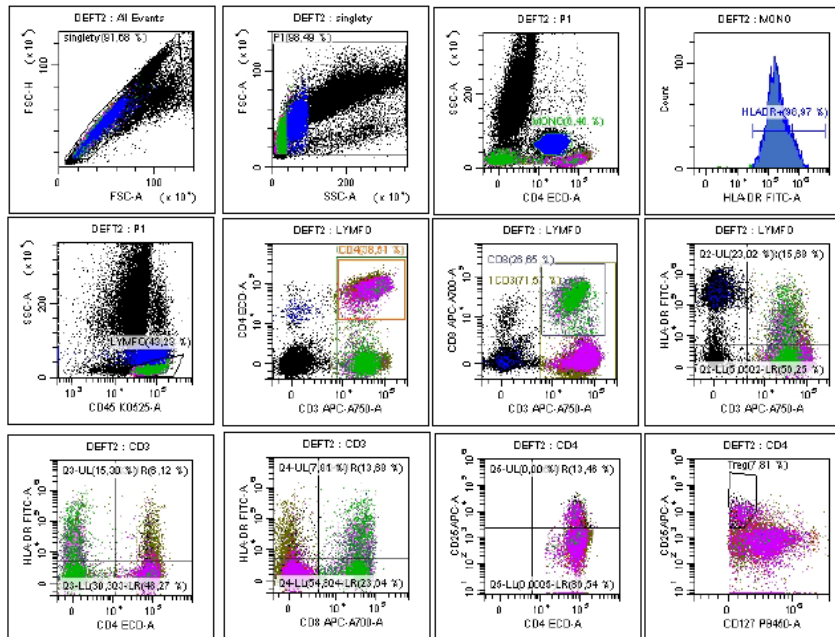
Vyšetření diferenciačních stadií lymfocytů



Vyšetření diferenciačních stadií T-lymfocytů



Item	Result	Unit
x-lymfocyt	74.1	%
x-CD3+	71.3	%
x-CD3+4+	33.3	%
x-CD3+8+	31.4	%
%RA+_CD4+	55.8	%
%RA+_CD8+	53.7	%
%CD57+_CD3+8+	26.7	%



Item	Result	Unit
x-monocyte	6.5	%
x-lymfocyt	43.2	%
x-CD3+	71.2	%
x-CD3+4+	38.5	%
x-CD3+8+	26.6	%
CD14+DR+	99.0	%
HLADR+	38.7	%
CD3+DR+	15.7	%
CD3+4+DR+	4.4	%
CD3+8+DR+	9.7	%
%RO+_CD4+	39.6	%
%RO+_CD8+	38.2	%
%CD25+_CD4+	13.5	%
%Treg_CD4+	7.8	%
%RTE_CD4+	50.1	%
%CD38+_CD3+8+	49.4	%
%CD38+_CD3+8+	31.6	%

CD45RA - naivní T lymfocyty

CD45RO - paměťové T lymfocyty

HLA-DR, CD38 - aktivované a efektorové T lymfocyty

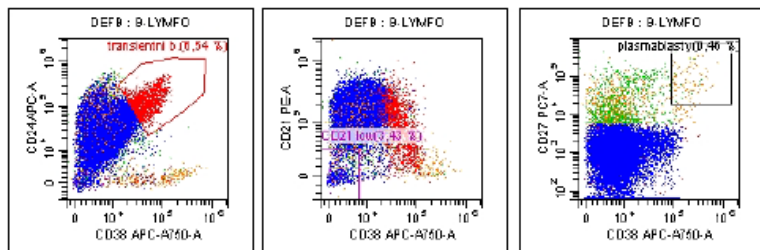
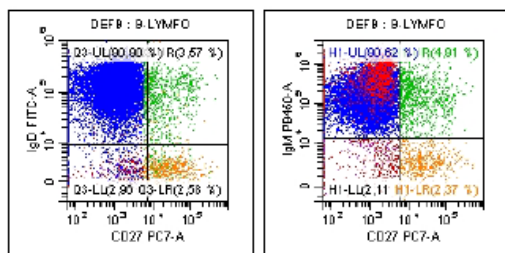
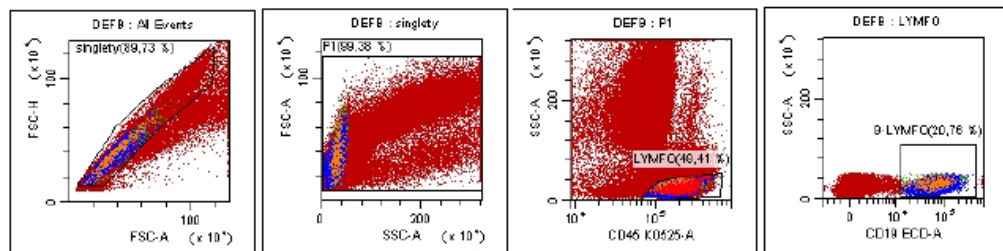
CD57 - vysoce diferencované T lymf. (vyčerpané, senescentní), neproliferují

Treg (CD4+FoxP3+CD25+CD127-) T lymf., regulační fce, potlačují přehnané nebo autoimunitní reakce

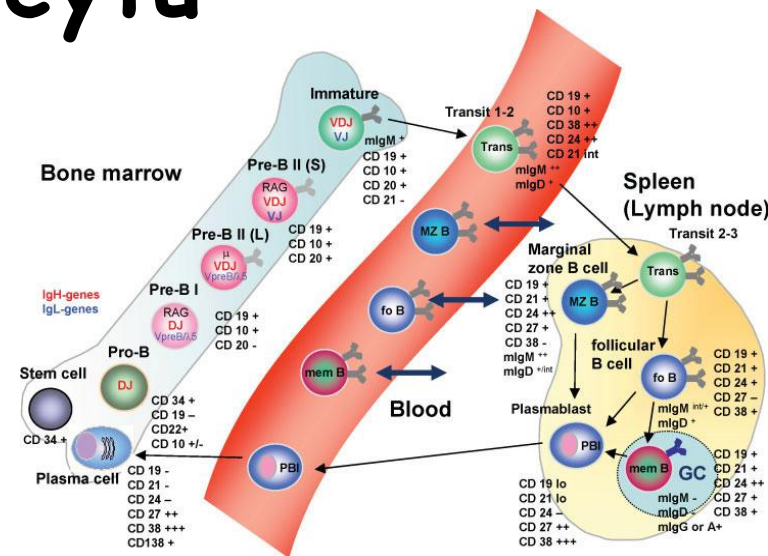
RTE - Recent Thymic Emigrants (CD31+) T lymf. - nezralé T lymf., které právě opustily thymus

CD127 - receptor pro IL-7, na naivních T lymf., exprese klesá po aktivaci

Vyšetření diferenciačních stadií B-lymfocytů



Item	Result	Unit
x-lymfocyty	49.4	%
x-CD19+	20.8	%
CD27-IgM+	90.6	%
CD27-IgM+	4.9	%
CD27-IgM-	2.4	%
CD21low	3.4	%
transientni_b	6.5	%
plasmablasty	0.5	%



IgM, IgD - receptory (BCR) pro antigen, na naivních B lymfocytech

IgM - již na nezralých B lymfocytech

IgD - na zralých naivních B lymfocytech - buňka je zralá a může migrovat do sek. lymf. orgánů

CD27 - aktivované a paměťové B lymfocyty

CD38 - aktivované B lymfocyty a plasmablasty, plasmatické bb

CD24 - tranzientní, aktivované a plasmatické buňky

CD21 - receptor pro C3d; na naivních B lymf. v periférii a folikulárních B lymf. v sek. lymf. org. - klíčová role v aktivaci B lymfocytů