

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE LIKVORU

Inka Matuchová

*Laboratoř pro likvorologii, neuroimunologii, patologii
a speciální diagnostiku, Topelex s.r.o*



PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Flow cytometry = **flow + cyto + metry** - *měření buněk v pohybu*

Měření a analýza fyzikálních a chemických vlastností buněk v proudu kapaliny během jejich průchodu laserových paprskem

HLAVNÍ ČÁSTI PRŮTOKOVÉHO CYTOMETRU

Fluidika

- zkumavka se vzorkem, nasátí a průtok vzorku (buněčná suspenze), tvorba fokusovaného proudu buněk jdoucí jednotlivě za sebou, měniče rychlosti a tlaku

Optika

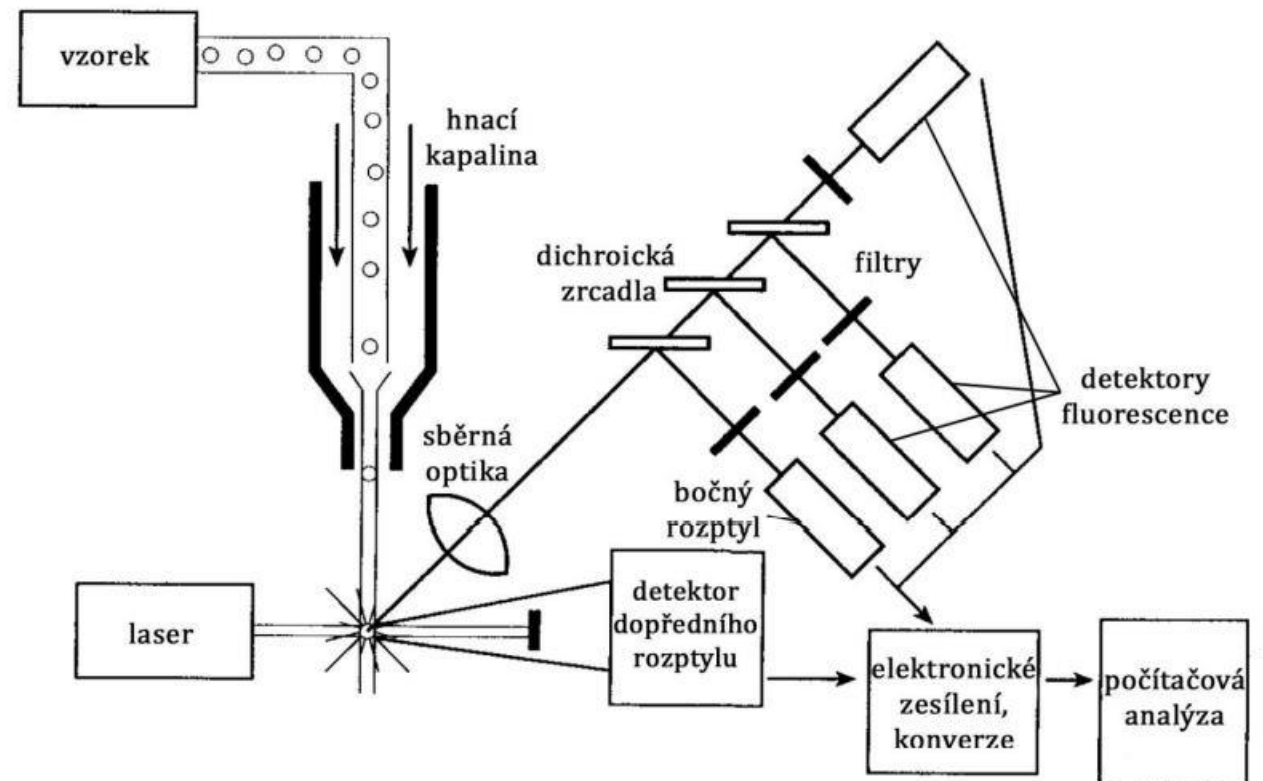
- zdroj záření a detektor elektromagnetického záření, filtry, hranoly atd.

Elektronika

- převod optického signálu na elektrický impuls

Počítačová analýza

- software (zpracování dat, statistika..)

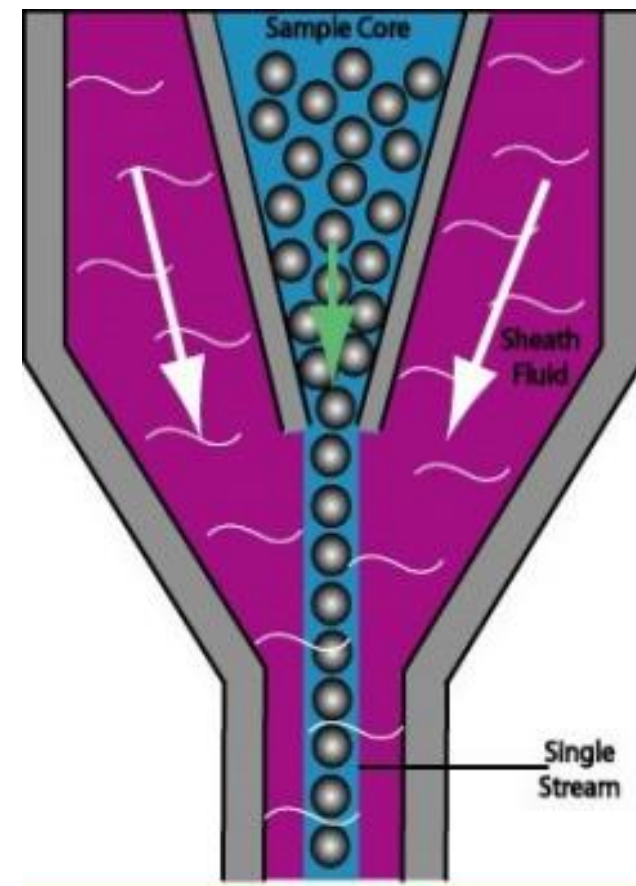


FLUIDIKA

- zajišťuje transport částic ze suspenze – unáší částice postupně za sebou do průtokové komory -> analýza jednotlivých částic

Hydrodynamická fokusace

- využívá unášení jednotlivých buněk proudem kapaliny
- vmísení proudu suspenze do rychleji proudící hnací kapaliny (sheath fluid)
- průchod jednotlivých částic paprskem a následná detekce fyzikálních a chemických vlastností (rozptyl, fluorescence)



OPTIKA

Excitační: zdroj světla (laserový paprsek)

Sběrná: hranoly, filtry, detektory..

MĚŘENÉ VLASTNOSTI:

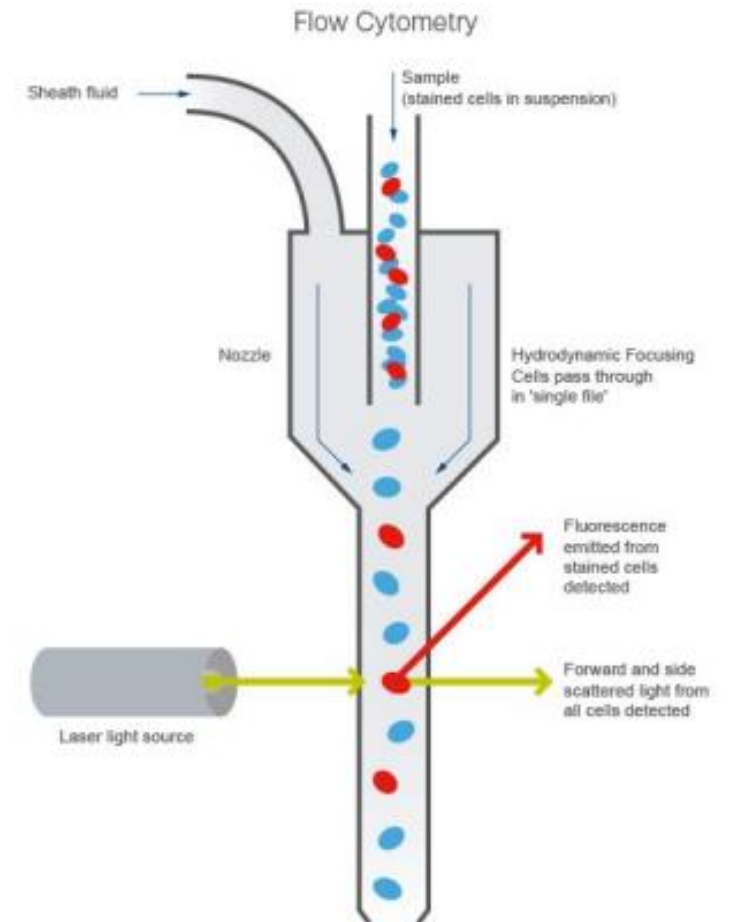
Přímý rozptyl (forward scatter, 20°) - FSC

→ velikost, tvar, homogenita částice

Boční rozptyl (side scatter, 90°) - SSC

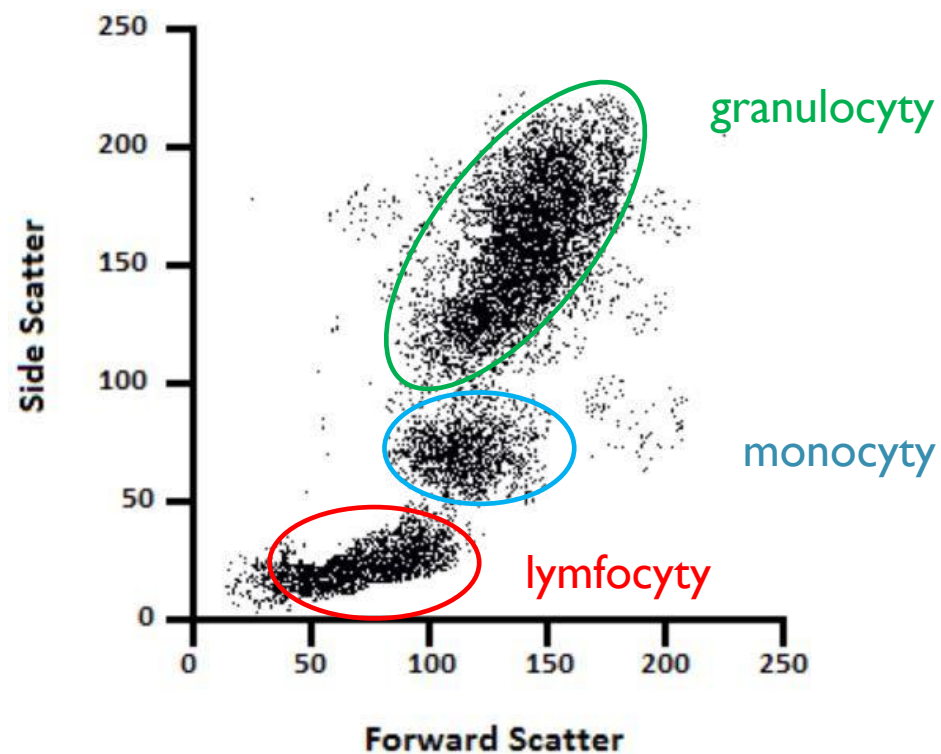
→ granularita

Fluorescence – FL značení antigenu protilátkou
konj. s fluorochromem)



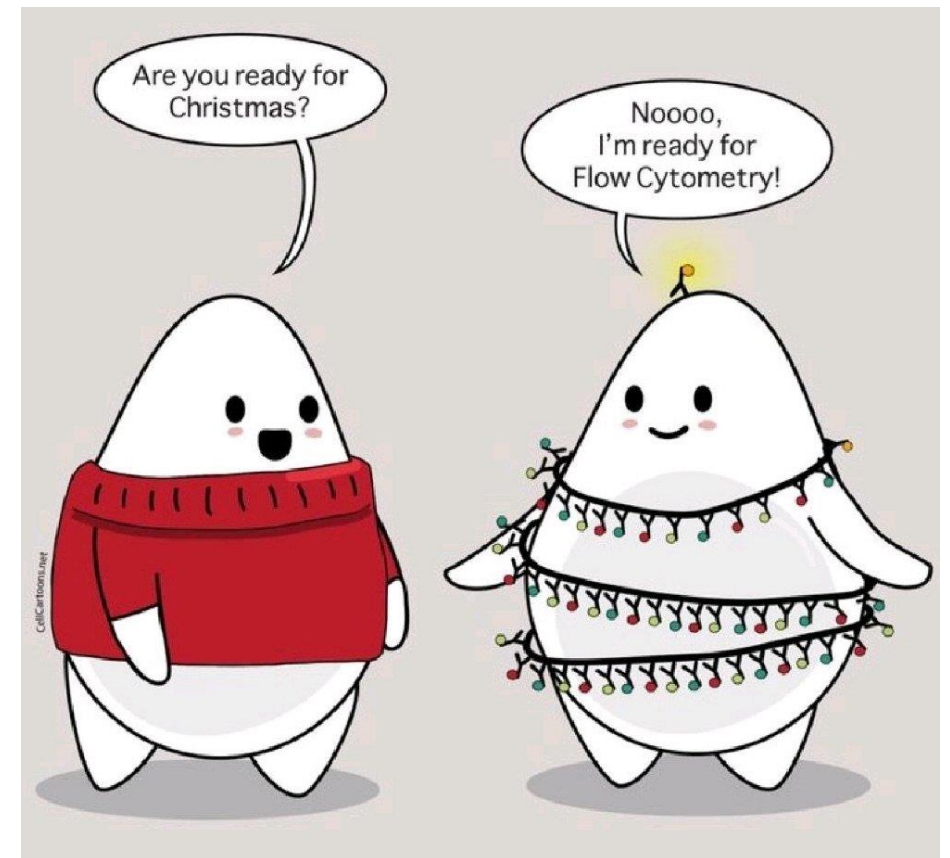
ZÁKLADNÍ SCATTER GRAM

Vynesení intenzity světelného signálu FSC proti SSC v bodovém grafu poskytující informace o morfologii buněčné populace



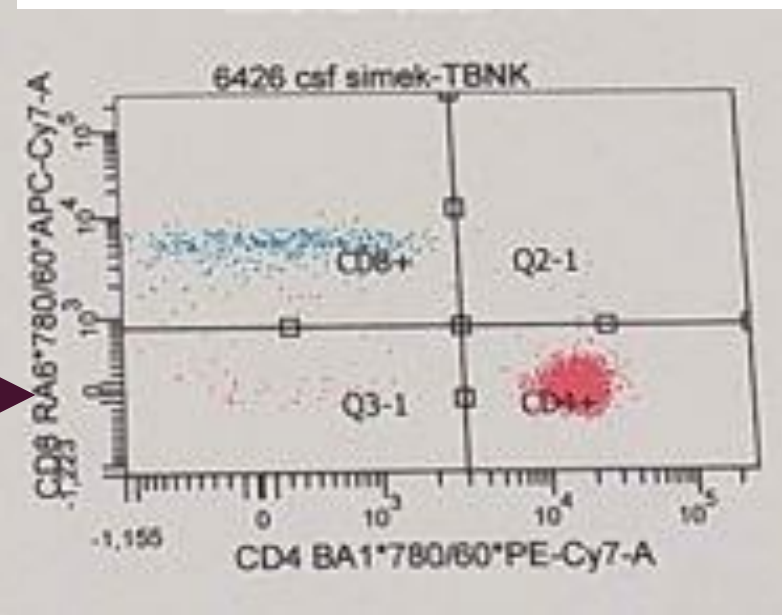
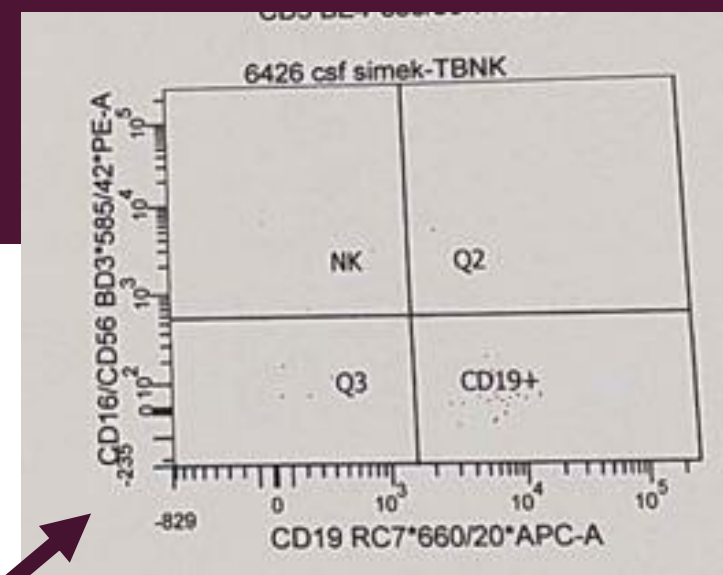
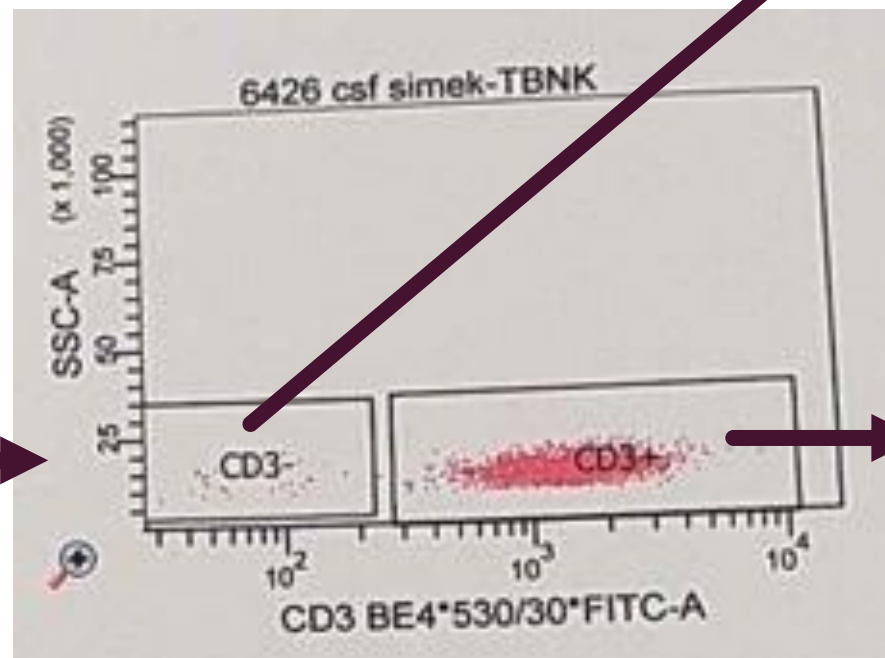
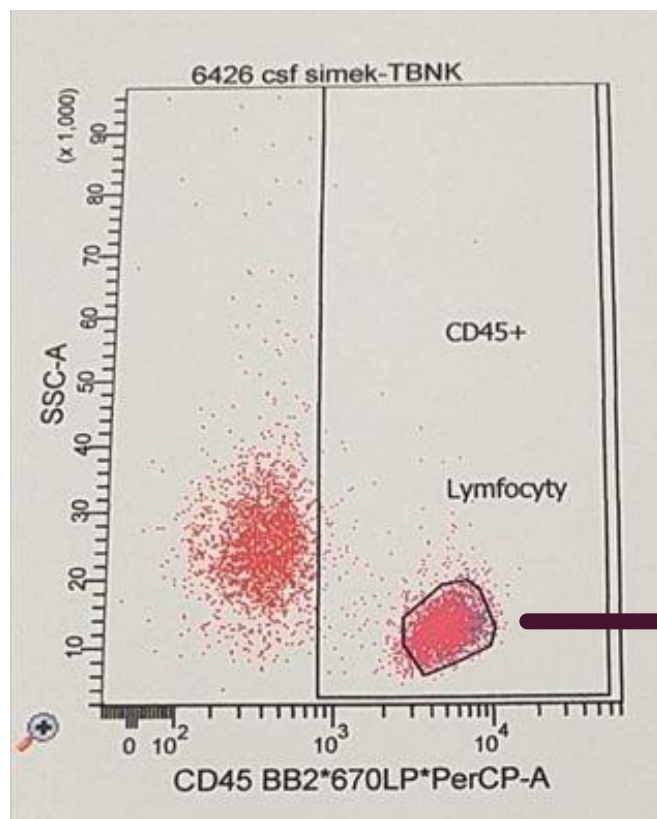
FLUORESECENCE

- bližší identifikace buněk na základě antigenních vlastností
- protilátky konj. s flurochromem, tj. s molekuly schopné fluorescence – emise světla o určité vlnové délce při dopadu laserového světla - > filtry -> detektor
- FITC, PE nebo tandemové flurochromy (excitováním primárního flurochromu dojde k excitaci sekundárního flurochromu, př. PE-Cy7 – horší stabilita)



GATING

ohraničení, které se používá pro vybrání pouze určité subpopulace analyzovaných buněk

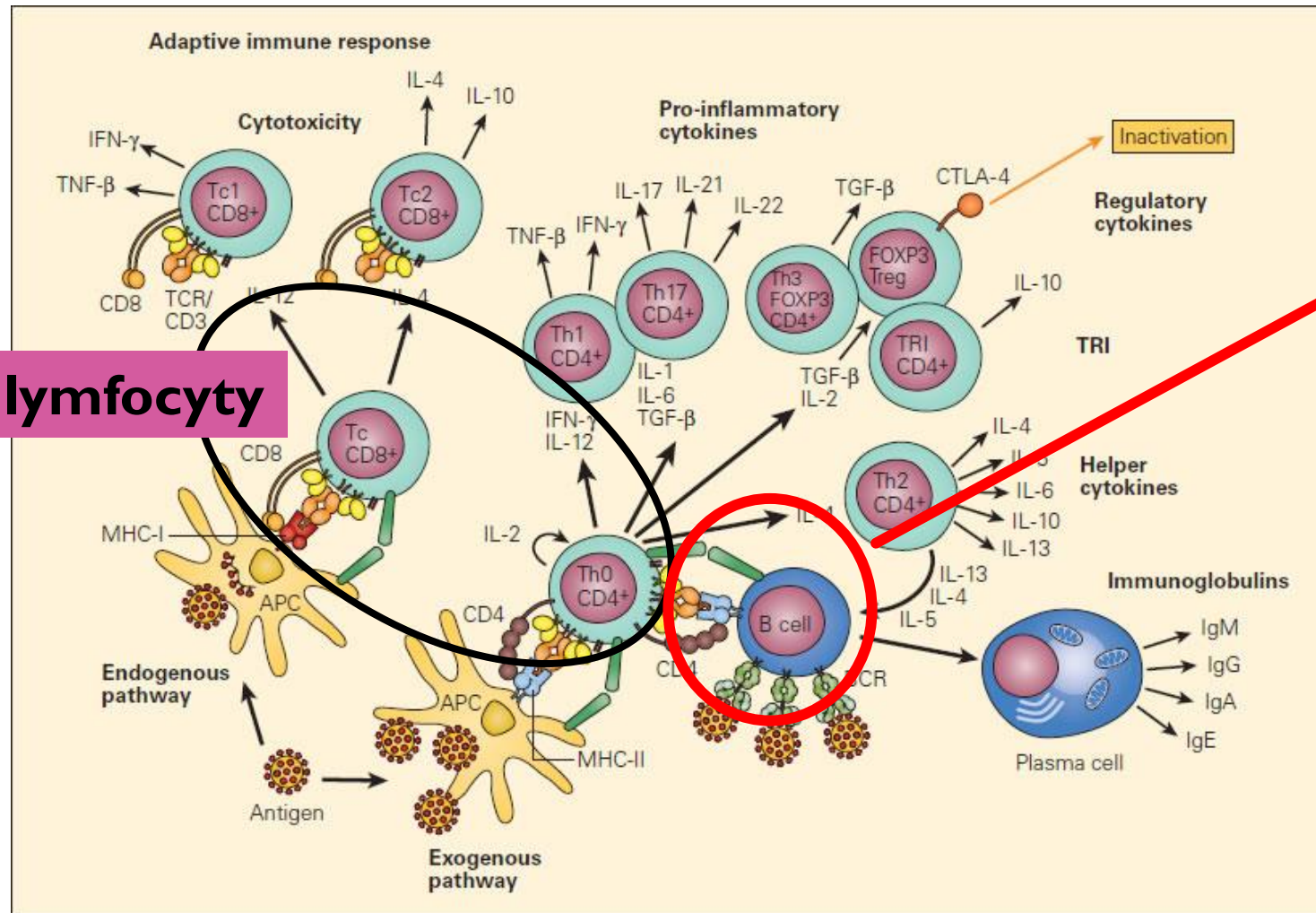


IMUNOFENOTYPIZACE

Klasifikace buněk za pomoci identifikace povrchových, cytoplazmatických nebo jaderných molekul specifických proteinů pomocí monoklonálních protilátek.

- CD (cluster of differentiation) – definují monoklonální protilátky na které se váží
- umožňují rozpoznání skupin buněk (T-lymfocyty, B-lymfocyty, NK buňky, monocyty....)

IMUNOFENOTYPIZACE LIKVORU



CD45+ : leukocyty

**CD19+ B-lymfocyty
(kappa/lambda)**

CD3+ T lymfocyty

BD Canto II®

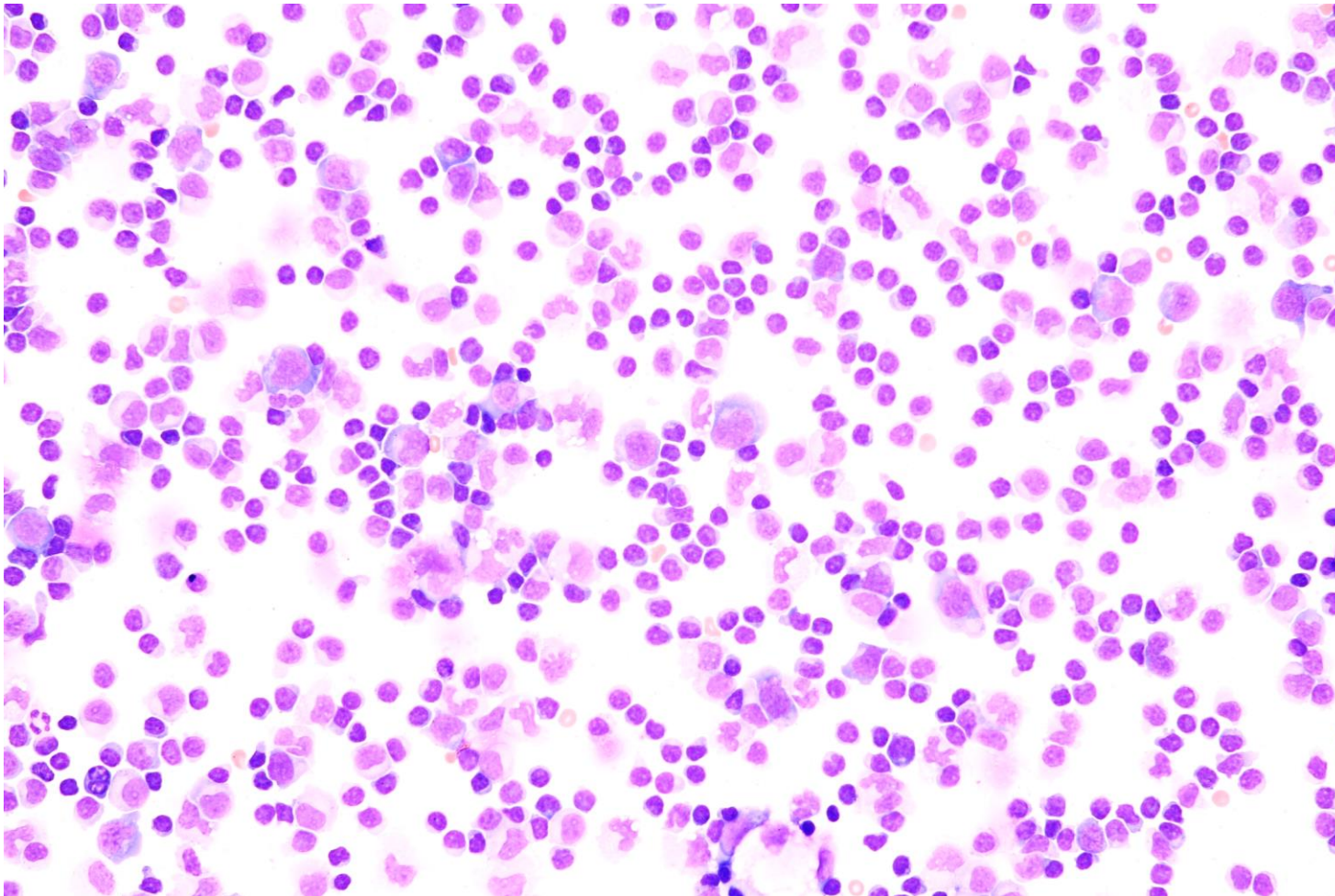
BD Biosciences

Základní fenotypizace lymfocytů:
CD45, CD3, CD8, CD4, CD19, CD56,
CD16

Klonalita B-lymfocytů: CD45, CD19,
CD20, kappa, lambda, CD5



KVALITATIVNÍ CYTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ LIKVORU A VÝZNAM PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE



?

**Význam v diff. dg.
lymfocytárních
celulizací v likvoru:**

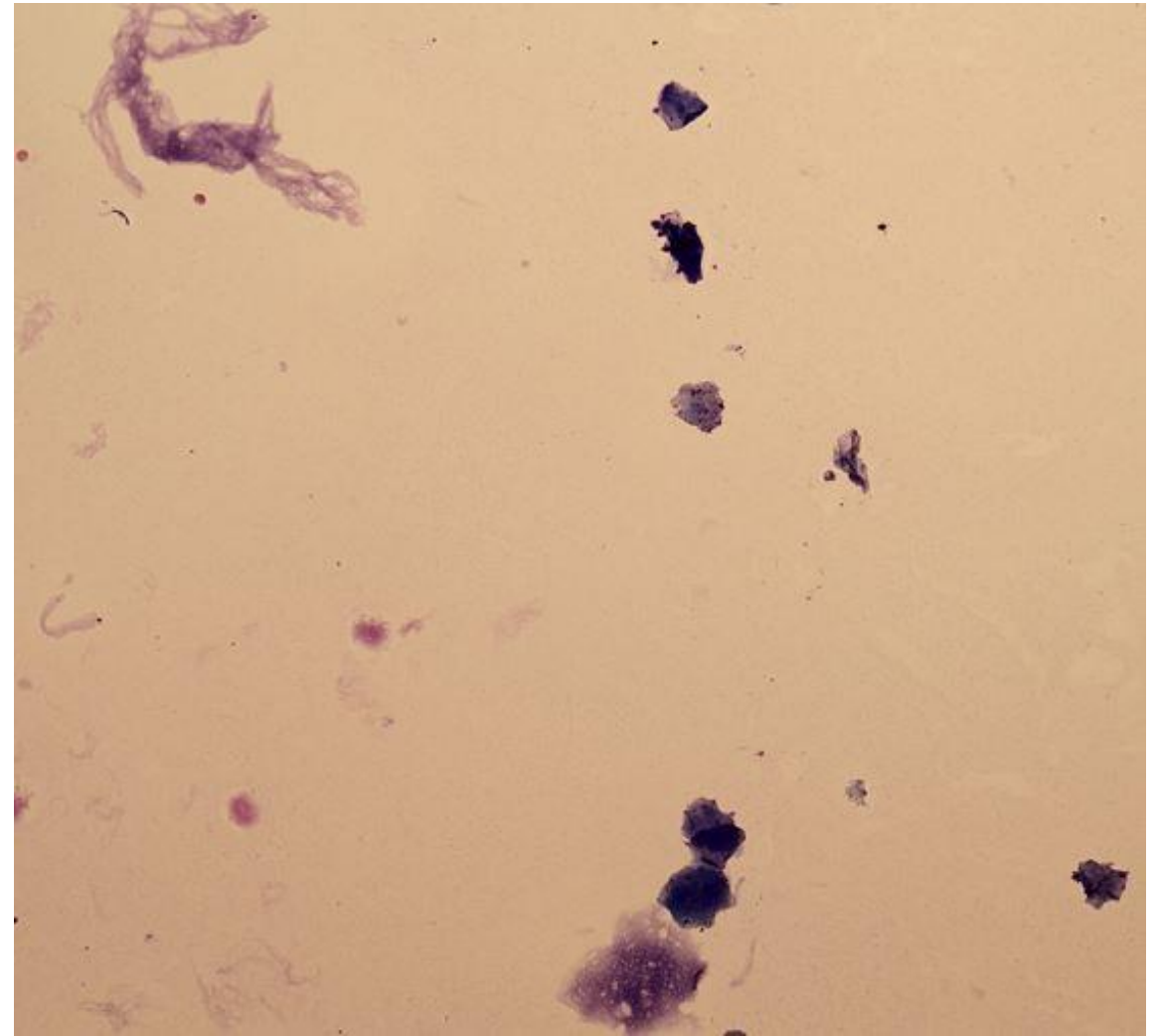
- Morfologické
cytologické vyšetření
nepostihne lymfocytární
subpopulace
- Virový x bakteriální
zánět x lymfomová
infiltrace....

ÚSKALÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE LIKVORU

- malý objem primárního vzorku
- přísná preanalytická fáze (2h od odběru)
- problém s oligocelulárními vzorky (nízký záchyt – hypotonické prostředí CSF – křehkost buněk! – každé promytí = ztráty
- optimalizace laboratorního protokolu – Transfix pro CSF, nelyzovat pokud není významně nutné! – stále nutno velký objem vzorku – nízký záchyt

ÚSKALÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE LIKVORU

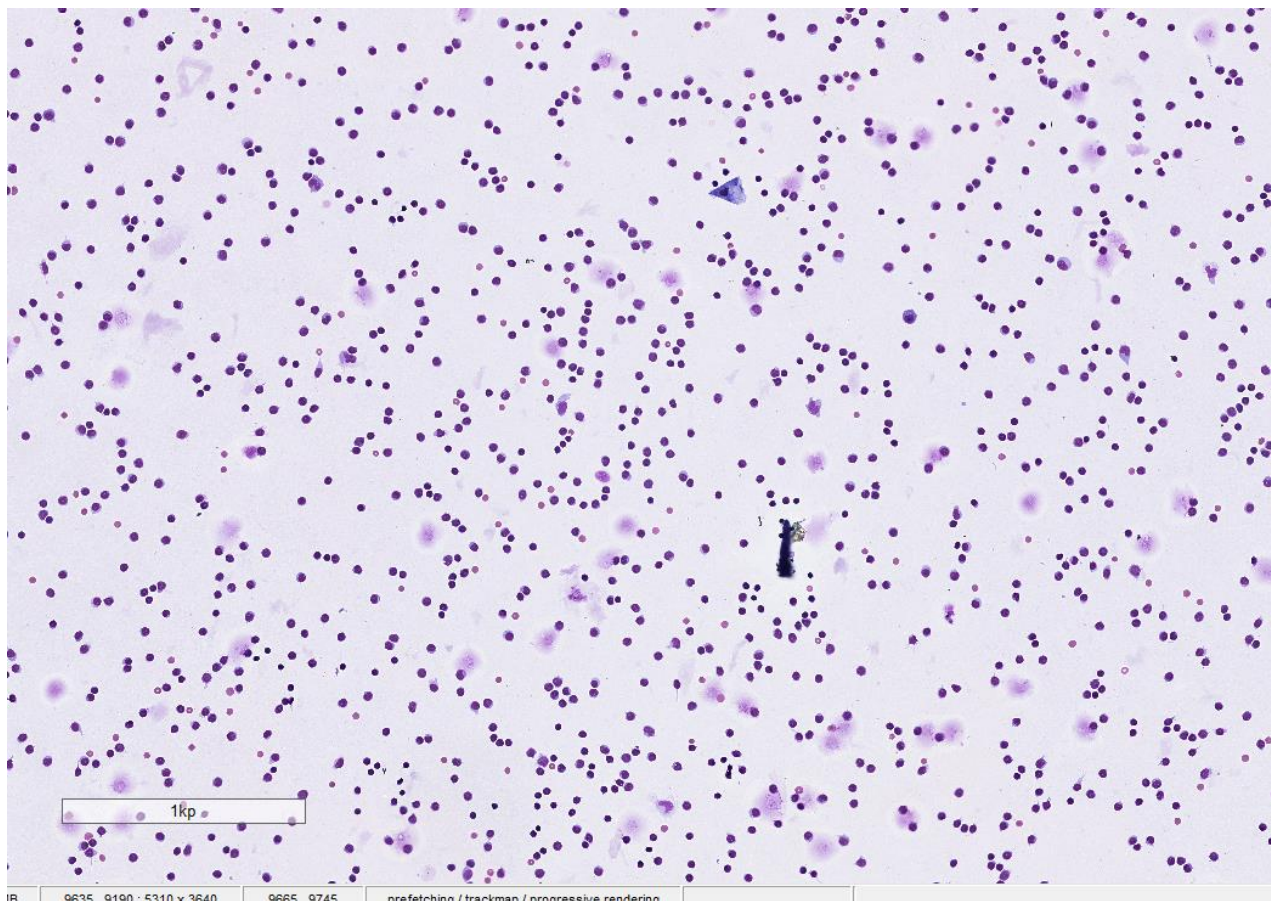
- debris (nehezké dot ploty) – v likvoru jsou nejen imunokompetentní buňky, ale také epiteliie a nespecifické nečistoty!
- občas obtížná interpretace



VÝZNAM PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE V LIKVORU- KAZUISTIKA

Pacient 55 let, paraparéza DKK – cca měsíc se rozvíjející, MR bez nálezu, nystagmus, tremor – v.s. psychogenní etiologie

Cytologický obraz likvoru



V cytologickém nálezu obraz lymfocytární pleocytozy:

Převažují menší až středně velké lymfocyty (cca 85% populace), nalezeny ale také lymfoplazmocyty a plazmocyty

VÝZNAM PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE V LIKVORU- KAZUISTIKA

VÝSLEDKY PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

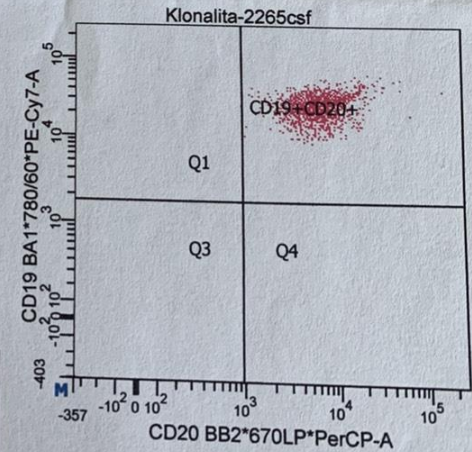
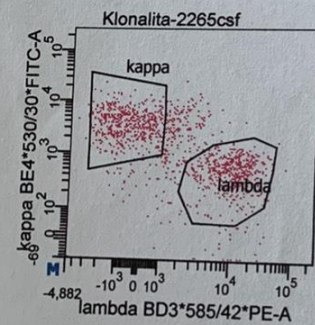
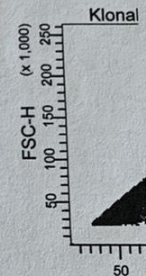
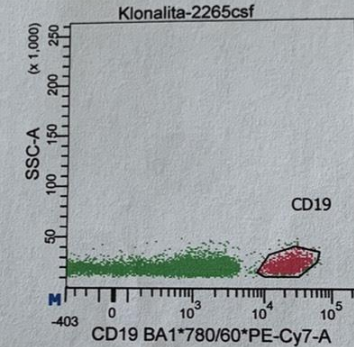
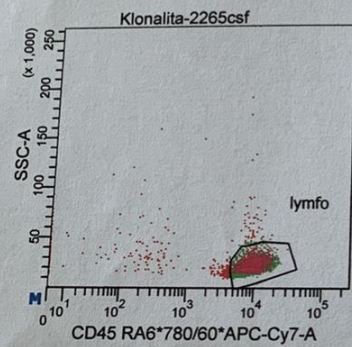
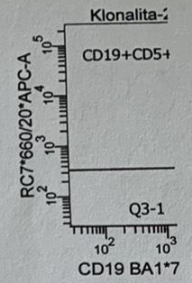
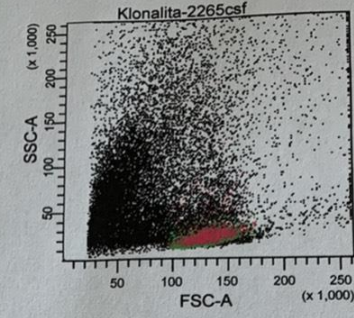
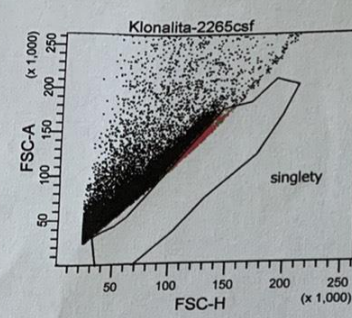
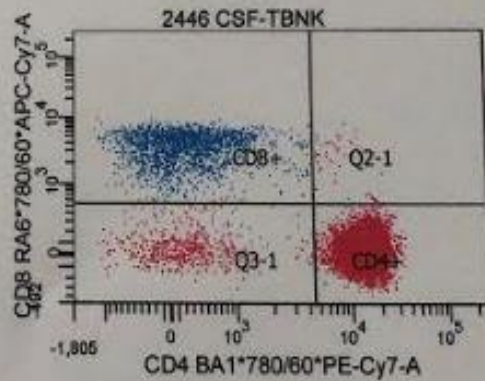
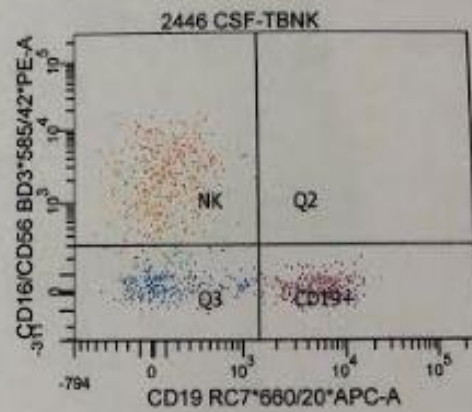
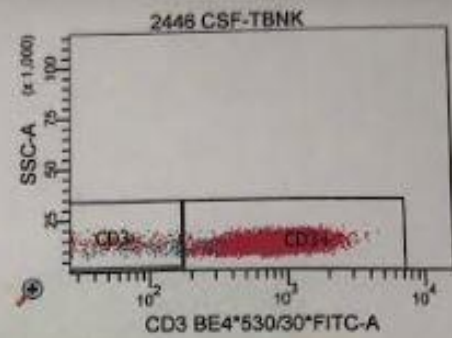
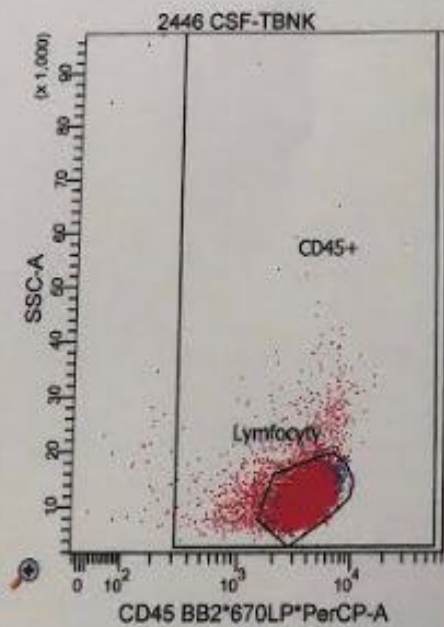
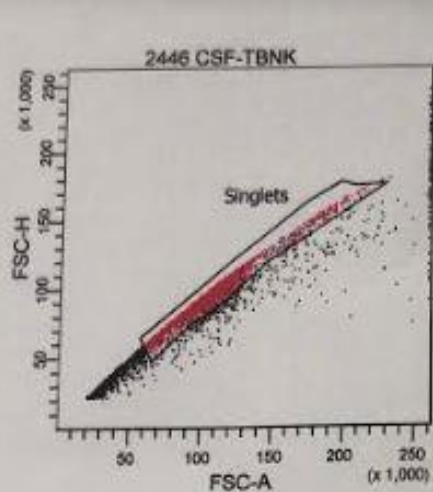
CD45+ lymfocyty (%)	93,4
CD4+ Th-lymfocyty (%)	67,6
CD8+ Tc-lymfocyty (%)	16,8
IRI (CD4/CD8)	4,02
CD19+ B-lymfocyty (%)	11
NK-buňky (%)	0,7
Klonalita CD19+ B-lymfocytů	Polyklonální

Dg. závěr: neuroborrelióza



LABORATORNÍ LIKVOROVÉ VÝSLEDKY

JE/μ	149	(<5)
CB (g/l)	1,99	(0,18-0,43)
KEB	7,81	(>28)
CXCL 13 (pg/ml)	302,67	(< 20)
IL-6 (pg/ml)	7,72	(<7,9)
IL-8 (pg/ml)	95,6	(<91)
SI00 (ug/l)	1,28	(0,304-1,60)
Anti-Boreliové protilátky ve třídě IgG v CSF	Pozitivní	

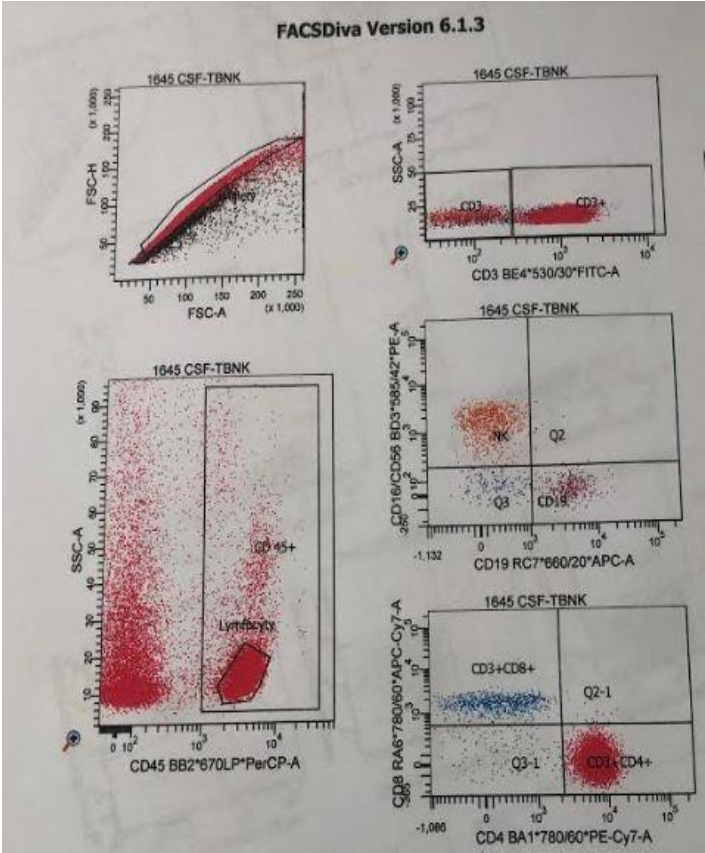


Experiment Name: Klonalita B-Ly_044
 Specimen Name: Klonalita
 Tube Name: 2265csf
 Record Date: May 12, 2021 7:04:22 PM
 SOP:

VYUŽITÍ IRI JAKO ORIENTAČNÍHO ROZCESTNÍKU V LIKVORU

Výrazně zvýšený IRI index a zvýšený rozsah anaerobního metabolismu v likvorovém kompartmentu - v.s Th I imunitní odpověď...

Běžným vyvolávajícím agens jsou intracelulární parazité (Treponema pallidum, Mycobacterium tuberculosis, fungi..), nádorové buňky v likvorovém kompartmentu



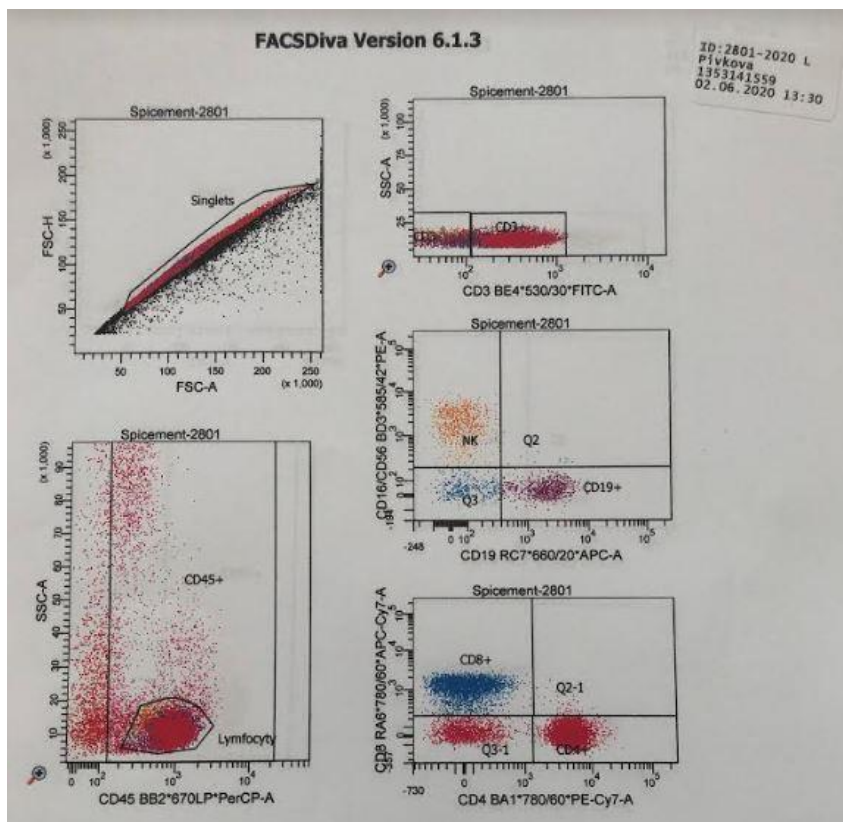
PARAMETRY LIKVORU VČ. FACS

JE/μ	221
Celková bílkovina (g/l)	3,3
KEB	19,8
CD45 lymfocyty (%)	64,6
CD4+ Th-lymfocyty (%)	62,8
CD8+ Tc-lymfocyty (%)	9,8
IRI (CD4/CD8)	6,4
CD19+ B-lymfocyty (%)	4,0
NK-buňky (%)	11,1
Cytologický nález	v.s nádorové buňky

VYUŽITÍ IRI JAKO ORIENTAČNÍHO ROZCESTNÍKU V LIKVORU

Snížený IRI index – v.s
cytotoxická zánětlivá
odpověď v likvorovém
kompartmentu..

*Běžným vyvolávajícím
agens jsou buňky
infikované viry,
intracelulárními mikrobi
nebo buňky po nádorové
konverzi*



PARAMETRY LIKVORU VČ. FACS

JE/ μ	517
Celková bílkovina (g/l)	1,1
KEB	21
CD45+ lymfocyty (%)	81,5
CD4+ Th-lymfocyty (%)	48,8
CD8+ Tc-lymfocyty (%)	26,6
IRI (CD4/CD8)	1,8
CD19+ B-lymfocyty (%)	6,1
NK-buňky (%)	5,3
PCR Borrelia	Pozitivní
PCR HHV6	Pozitivní

PERSPEKTIVY KOMPLEXNÍ LIKVOROVÉ CYTOLOGIE

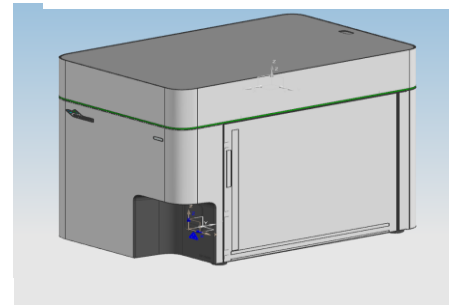
*Automatizovaný
cell- counting*



Digitalní morfologie



Průtoková cytometrie



Konvenční mikroskopie



Digitální mikroskopie



Děkuji za pozornost

