A fehérvérsejtek kvalitatív vizsgálata

Kristóf Katalin
Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet,
Mikrobiológiai Laboratórium

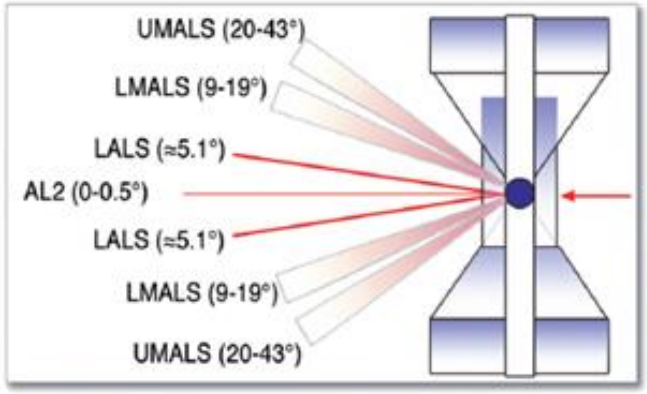
Kvalitatív vérkép

	Újszülött	Gyermek	Felnőtt
Limfocita	20-70%	25-50%	20-40%
Monocita	1-10%	1-6%	3-8%
Neutrofil granulocita	15-60%	25-60%	40-70%
Pálcikamagvú	1-8%	3-6%	1-2%
Eozinofil granulocita	1-5%	1-5%	1-5%
Bazofil granulocita	0-1%	0-1%	0,5-1%

Hematológiai analizátorok:
Fehérvérsejt meghatározás



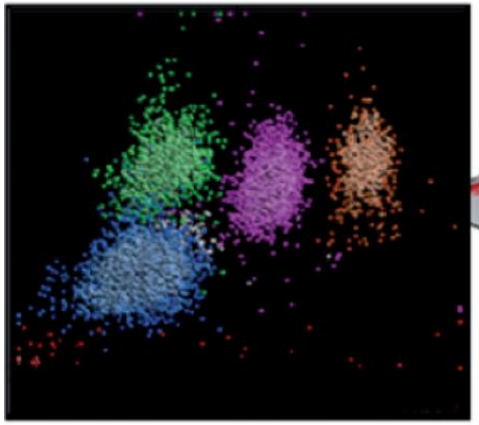
Optikai, fényszórás (vagy szórt lézer) elvű mérés 5 lézer detektorral

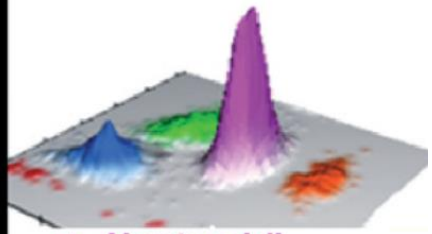


Beckman Coulter DXH-800

- Volume (térfogat)
- Conductivity (vezetőképesség)
- Axial light loss (AL2) → **fényáteresztő képesség (transparency)**
- Low angle light scatter (LALS) → **sejt komplexitás**
- Median angle light scatter (MALS)
- Lower median angle light scatter (LMALS)
- Upper median angle light scatter (UMALS)

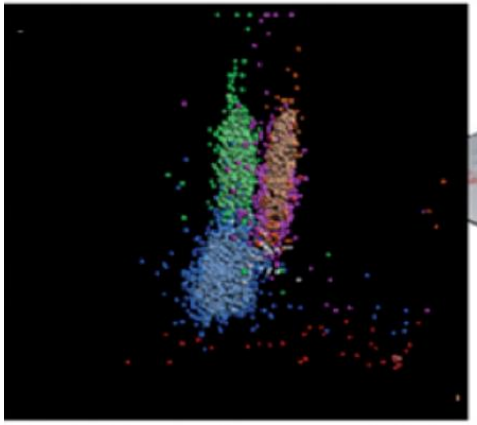
→ **sejt granularitás, sejtmembrán felszíne**

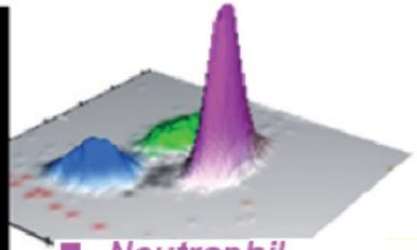




Diff 1: Volume vs RMALS

- Neutrophil
- Lymphocyte
- Monocyte
- Eosinophil
- Basophils
- Non-White Cells





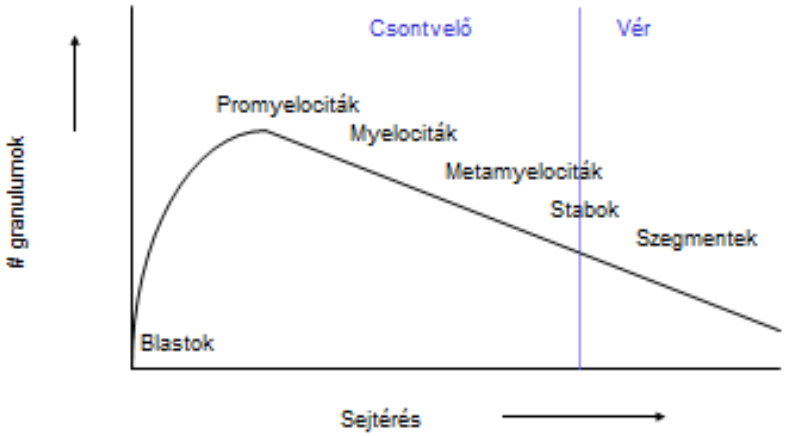
Diff 2: Volume vs OP

- Neutrophil
- Lymphocyte
- Monocyte
- Eosinophil
- Basophils
- Non-White Cells

Fehérvérsejt meghatározás:

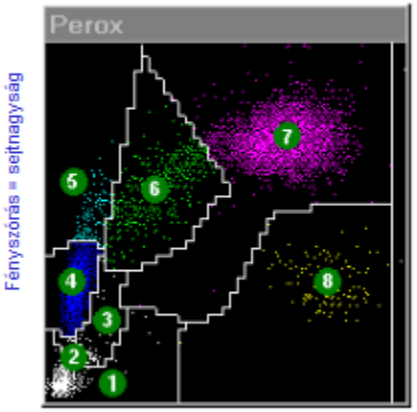
Több csatornás meghatározás, pl. peroxidáz és bazofil csatornán történő mérés

A granuláltság foka a neutrofil granulocitákban

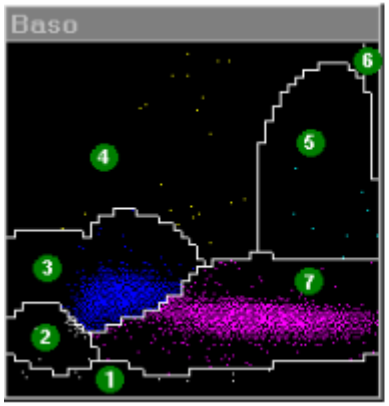


„Flag”-ek => kvalitatív vérkép!

A peroxidázmódszer



Bazofil csatornán mérés



Fehérvérsejt paraméterek és „flag”-ek

- IG (immature granulocytes):

  éretlen neutrofil alakok a periférián

  – metamyelocita, myelocita,promyelocita
- Left Shift: balra tolódás

  emelkedett pálcika magvú granulocitaszám

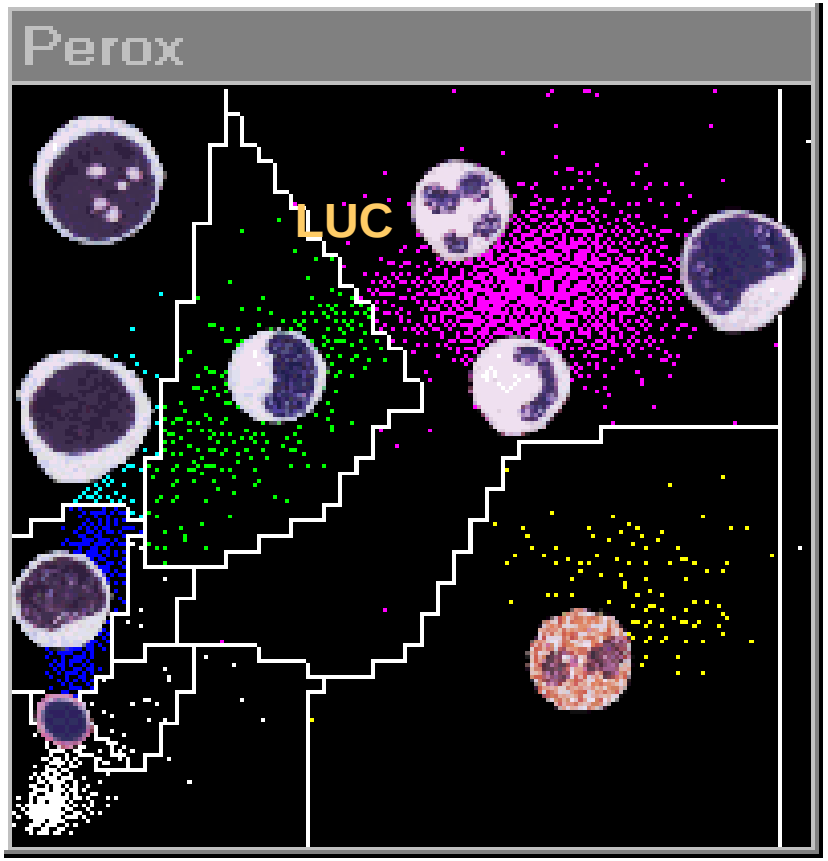
- LUC (large unstained cells):

  peroxidáz negatív blastok, atípusos limfociták és limfoid sejtek, hajas sejtek, plazmasejtek, veleszületett vagy szerzett myeloperoxidáz deficiencia

LUC (Large Unstained Cells)

Nagy nem festődő sejtek:

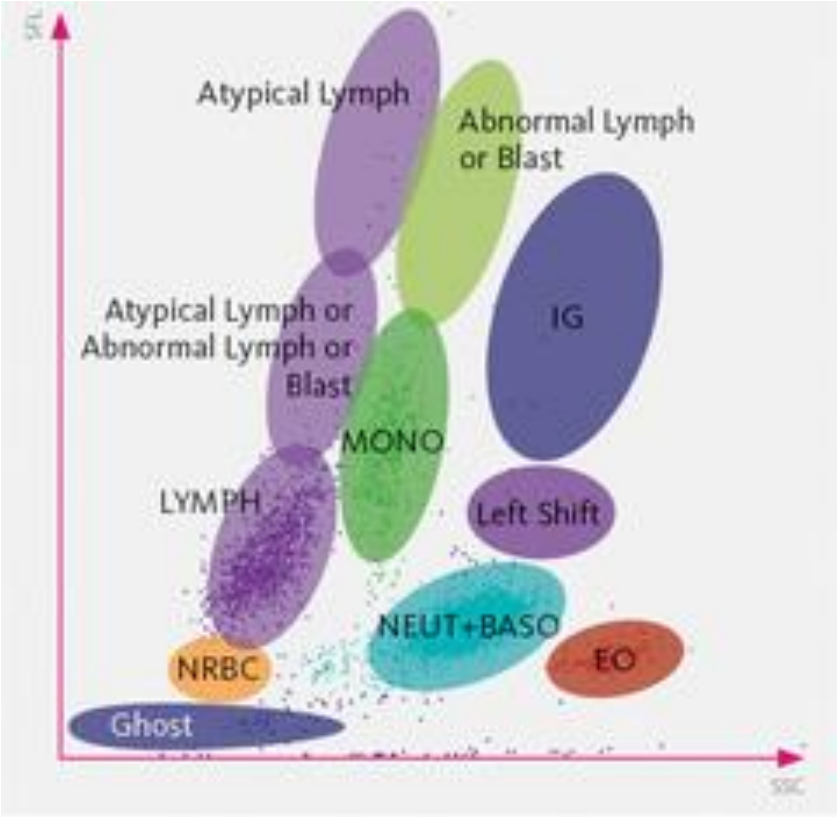
- Aktivált limfociták
- Plazmasejtek
- Hajas sejtek
- Gyermekkori nagy limfociták
- Mieloperoxidáz negatív blasztok
- Mieloperoxidáz negatív neutrofil granulociták

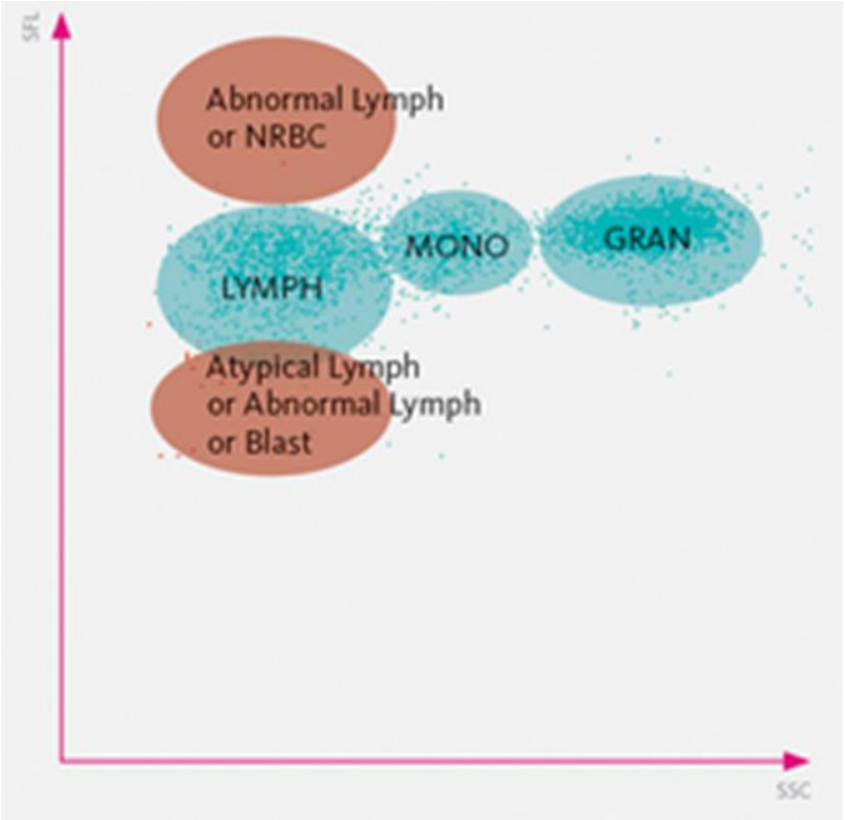


Morfológiai flag-ek:

- **ATYP** (Atípusos limfociták)
- **BLASTS** (Blasztok)
- **MPO** (Mieloperoxidáz hiány)

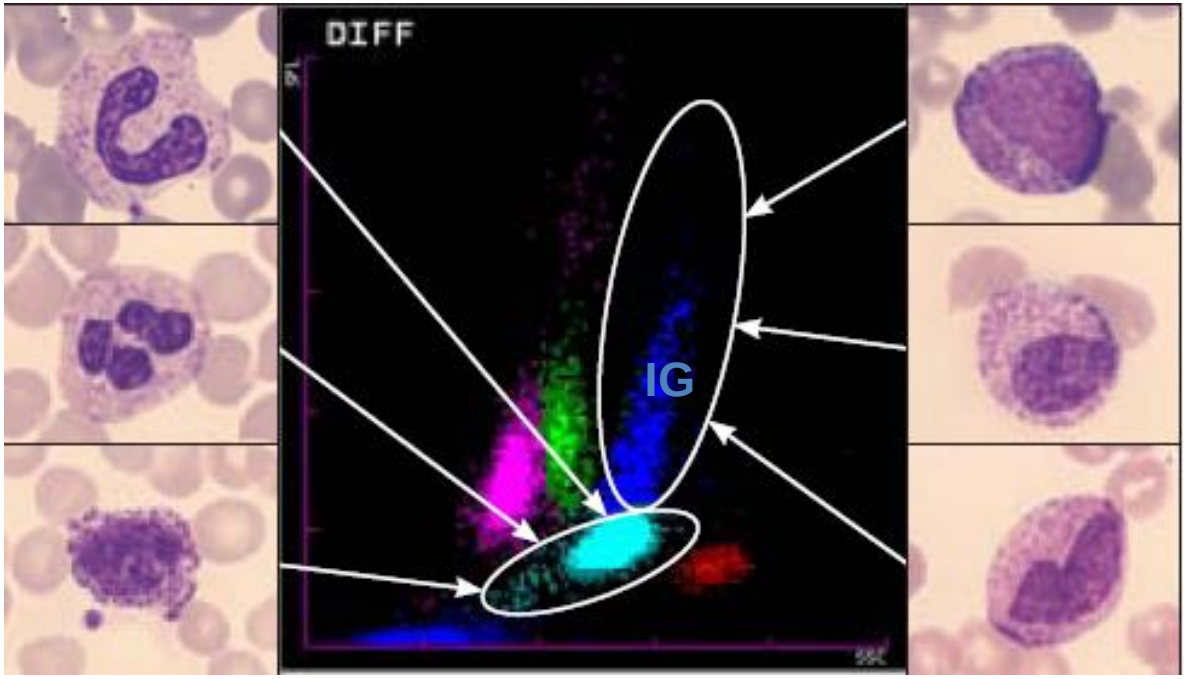
Fluoreszcens festés alkalmazása (pl.SYSMEX):
Kvázi intakt sejtekben festi a DNS-t /RNS-t fluoreszcens markerekkel.
Fluoreszcencia és fénytörés alapján differenciál.
Legerősebb fluoreszcens jel az éretlen / aktivált sejtekben van.





Sejtpermeabilitás függ a membrán lipid tartalmától (a lízis puffer zsíroldékony)
=> aktivált limfociták /NRBC jobban festődnek
Blasztok: kevés lipid, alacsony a fluoreszcens jelzés
Sejtméret + komplexitás + fluoreszcens intenzitás kombinálása

IG (Immature Granulocytes)



Promielocita

Mielocita

Metamielocita

Emelkedhet:

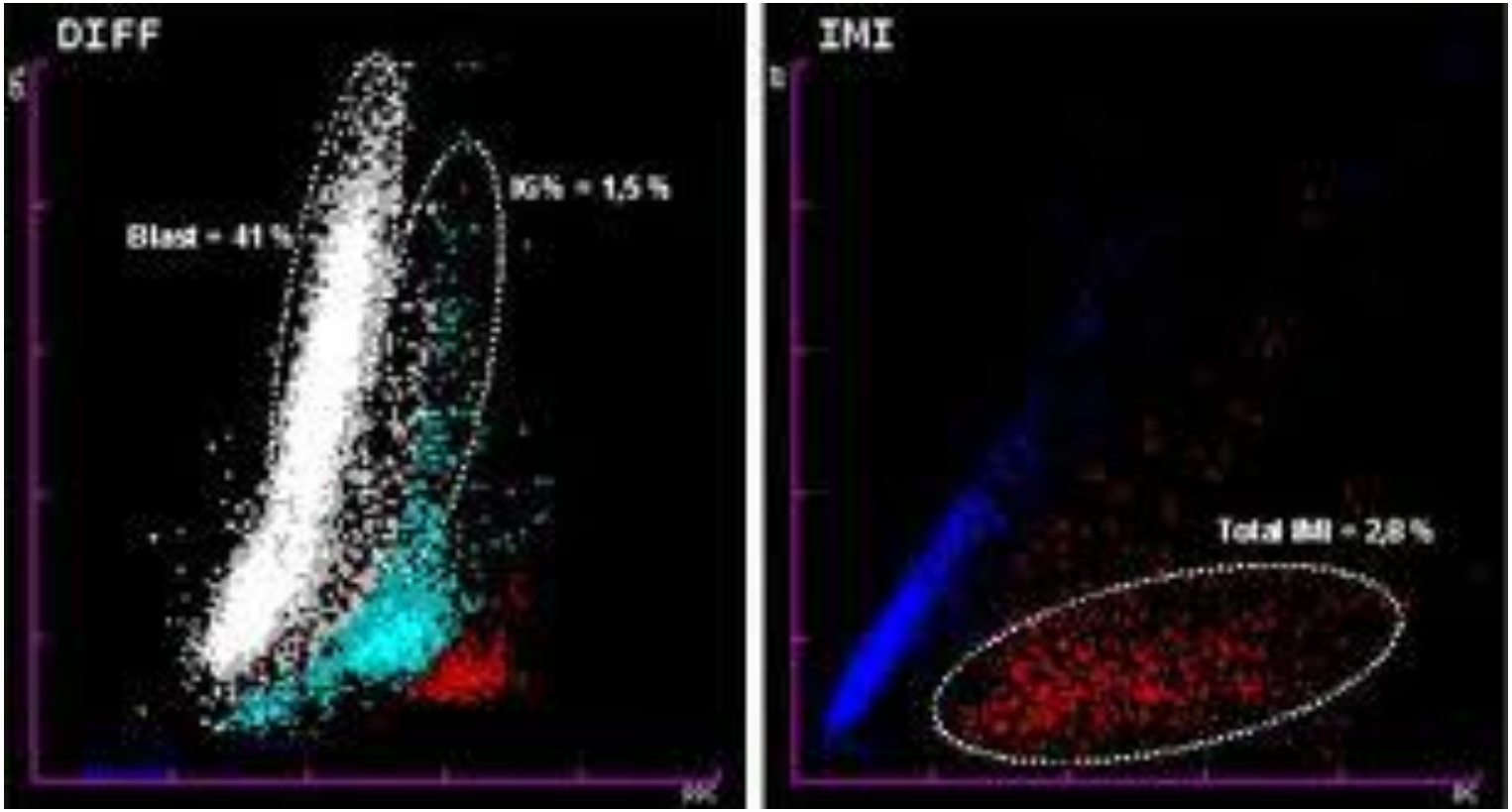
Bakteriális infekció , akut gyulladás !

- **Idősek, újszülöttek, koraszülöttek akut infekció**
- **neutropeniával járó szepszis**
- **mieloszupresszált betegek akut infekció**

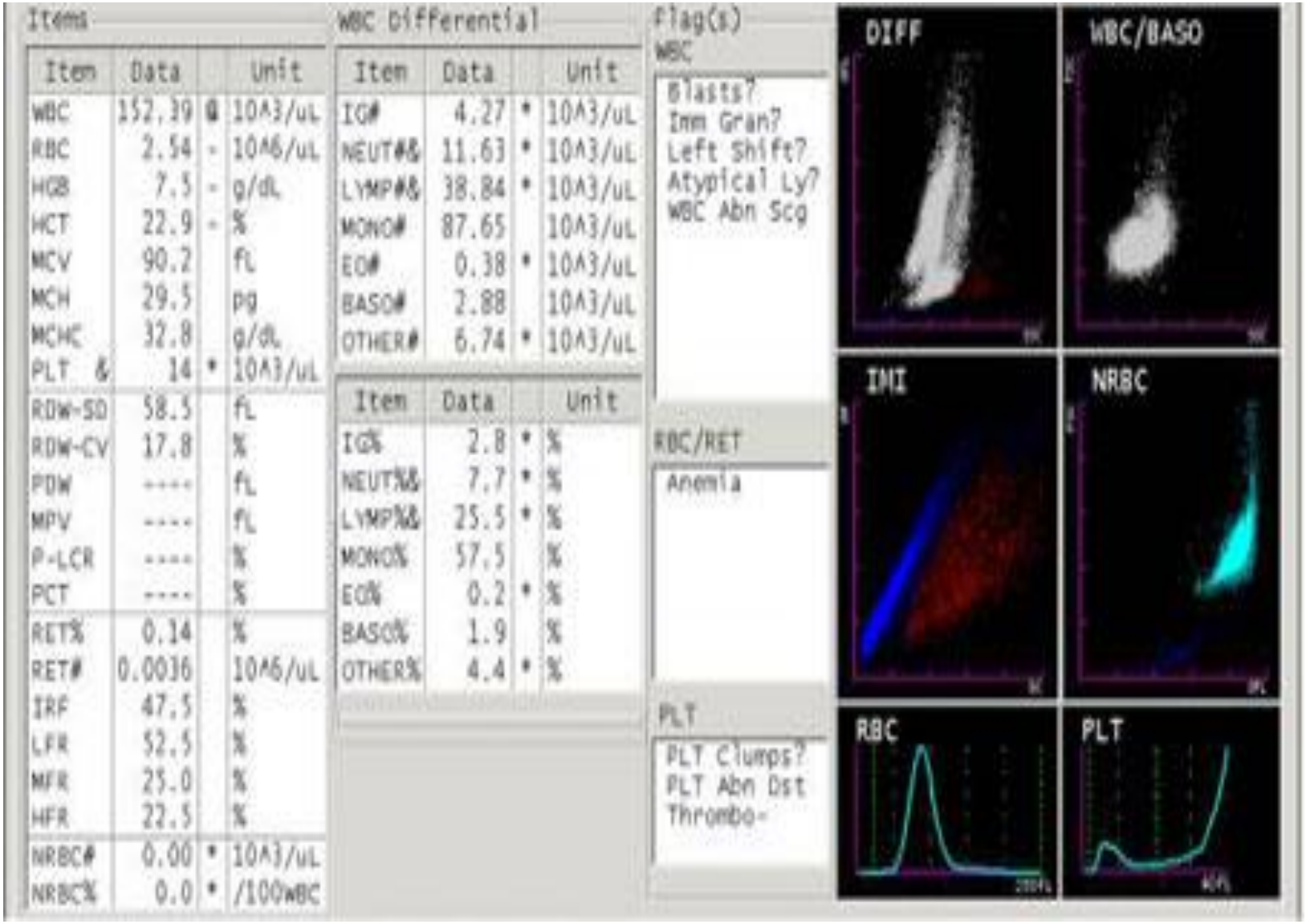
Tumor (csontvelő metastasis)
Akut transzplantátum rejekció
Myeloproliferatív betegség
Terhesség (harmadik trimeszter)

Szövet nekrózis
Sebészeti, ortopédiai trauma
Szteroid

Kóros felhődiagramok



ALL scattergram



AML M5b scattergram

Egyéb fehérvérsejtekre vonatkozó paraméterek:
Neutrofil granulociták méreteloszlása

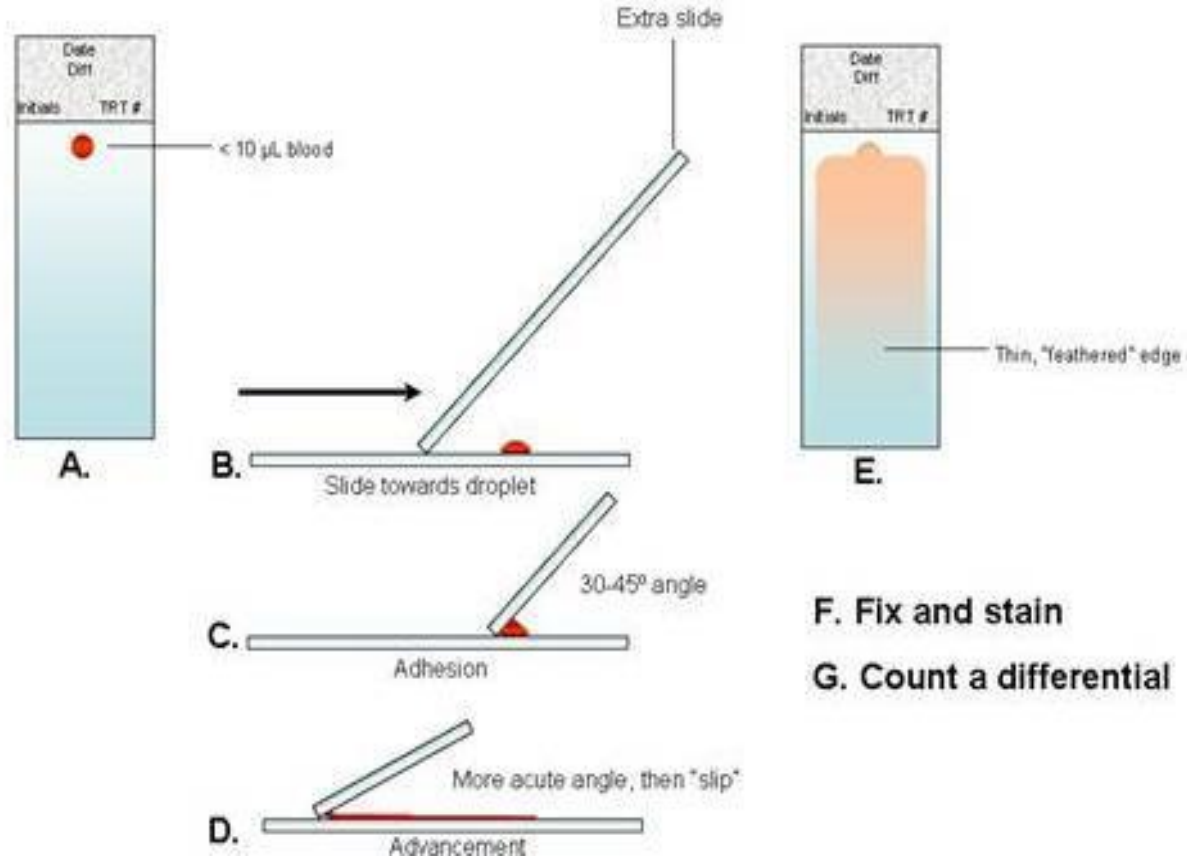
Mean Neutrophil Vol (átlagos neutrofil volumen)
Neutrophil Distribution Width (NeDW)

Mean Monocyte Vol
Monocyte Distribution Width

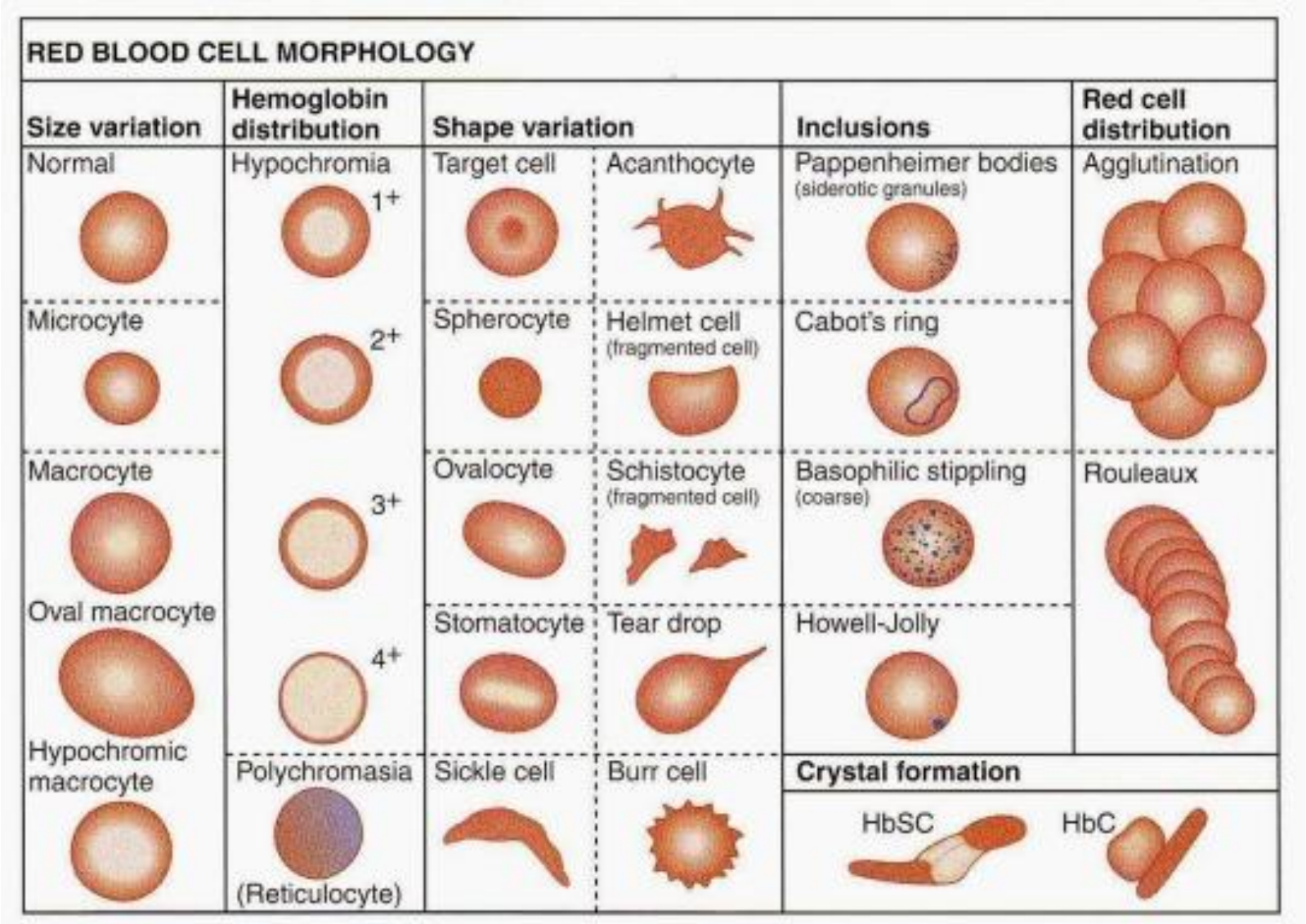
- Szepszisben, akut bakteriális infekcióban nő
- Normál WBC és % neutrofilszám mellett is emelkedik
- Lokalizált fertőzésben is nő
- Hasonló jelentősége van a monocita-markereknek

Parameter	Cut-off values	Sensitivity (%)	Specificity (%)
MNV	156.5	83.3	78
	150.5	88.9	52.5
	146.5	94.4	44.1
MMV	181.5	77.8	74.6
	175.5	83.3	59.3
CRP (mg/L)	69.95	83.3	52.5
Procalcitonin (ng/mL)	0.32	94.4	72

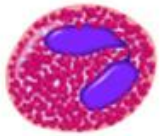
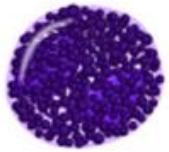
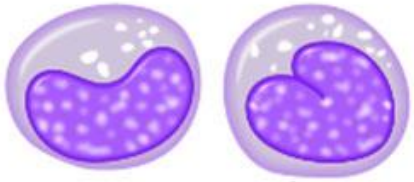
Perifériás kenet készítése



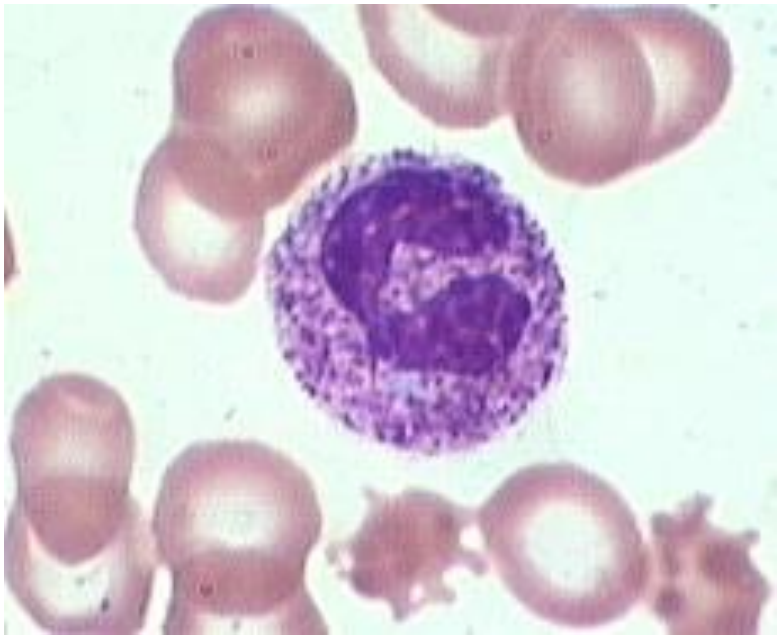
Vörösvérsejt anomáliák



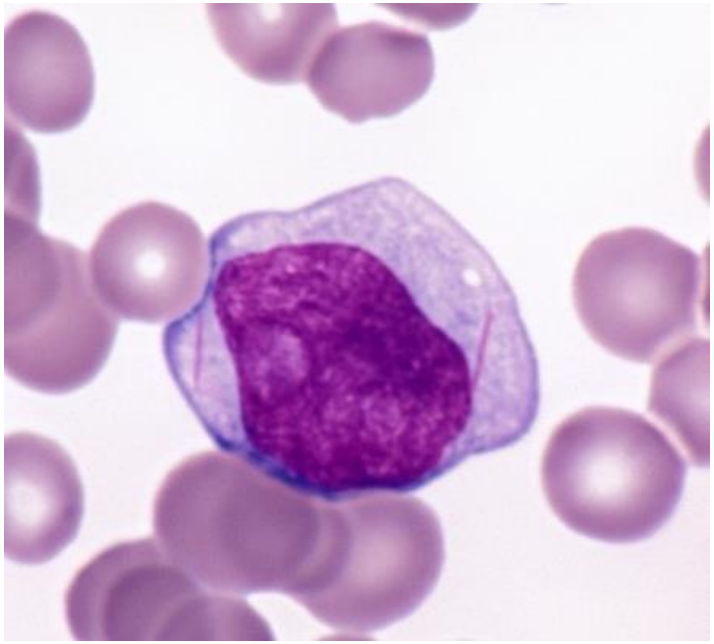
Fehérvérsejtek

Subtype	Nucleus	Function	Example
Neutrophil	Multi-Lobed	Bacterial or fungal infection. These are the most common first responders to microbial infection.	
Eosinophil	Bi-Lobed	Parasitic infections and allergic reactions (inflammatory).	
Basophil	Bi/Tri-Lobed	Allergic and antigen response (releases histamine causing vasodilation).	
Lymphocyte	Deep Staining, Eccentric	Include B cells, CD4+ helper T cells, and CD8+ cytotoxic T cells. Operate primarily in the lymphatic system.	
Monocyte	Kidney Shaped	Phagocytosis of pathogens. Presentation of antigens to T cells. Eventually, they become tissue macrophages, which remove dead cell debris and attack microorganisms.	

Fehérvérsejt anomáliák



Toxikus granuláció



Auer pálca AML M2

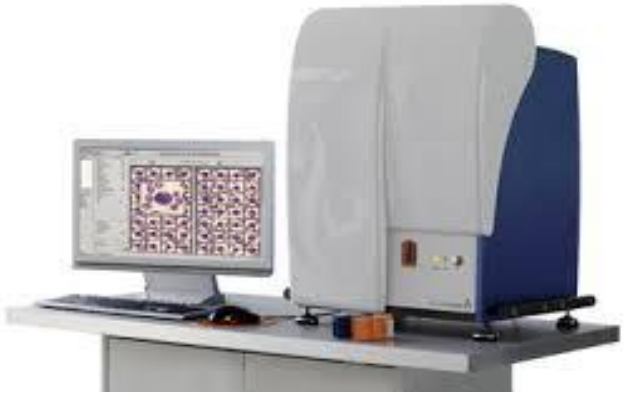
Automata kenetfestő és kenetértékelő rendszerek

Sysmex SP 1000i kenetfestő

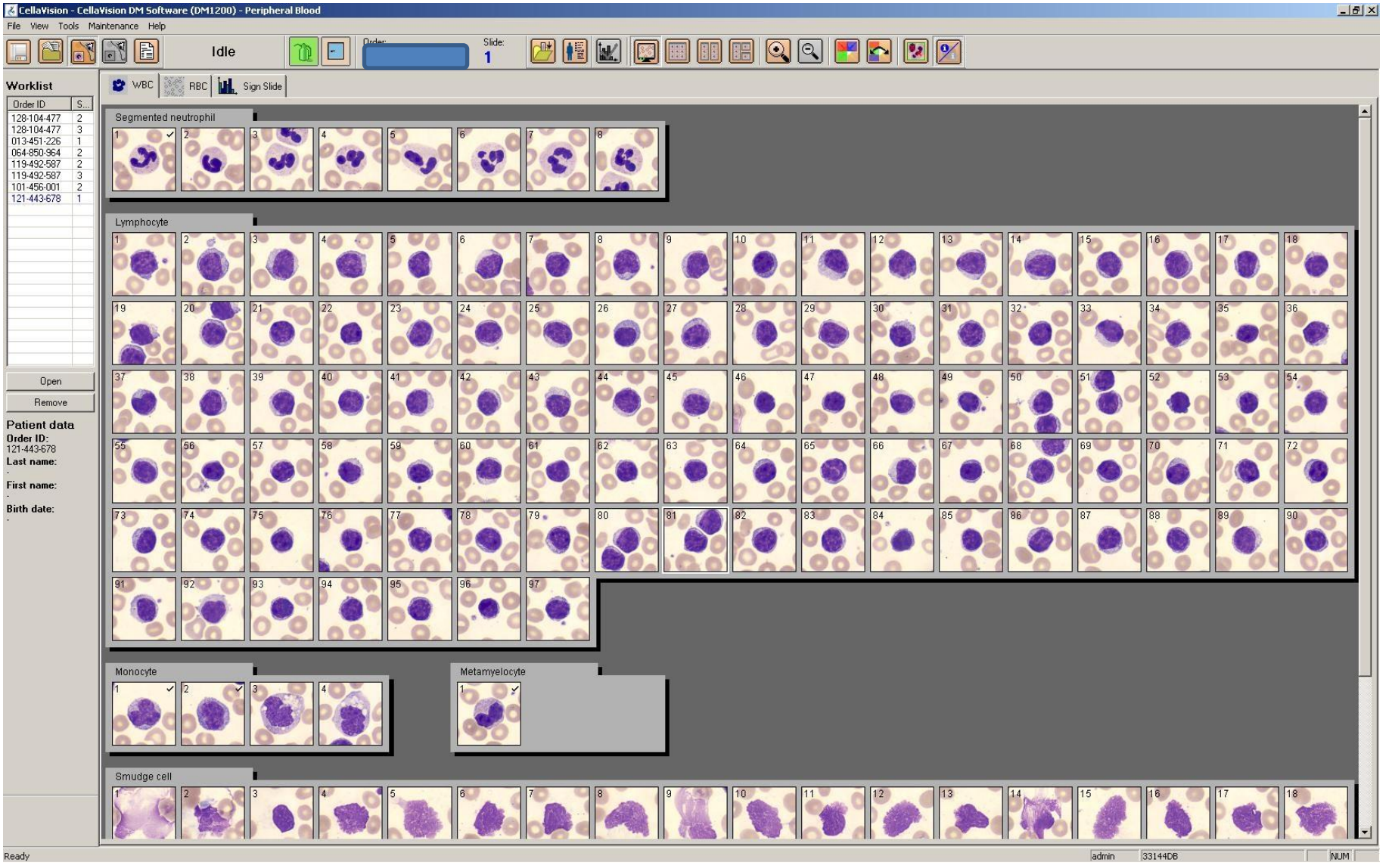


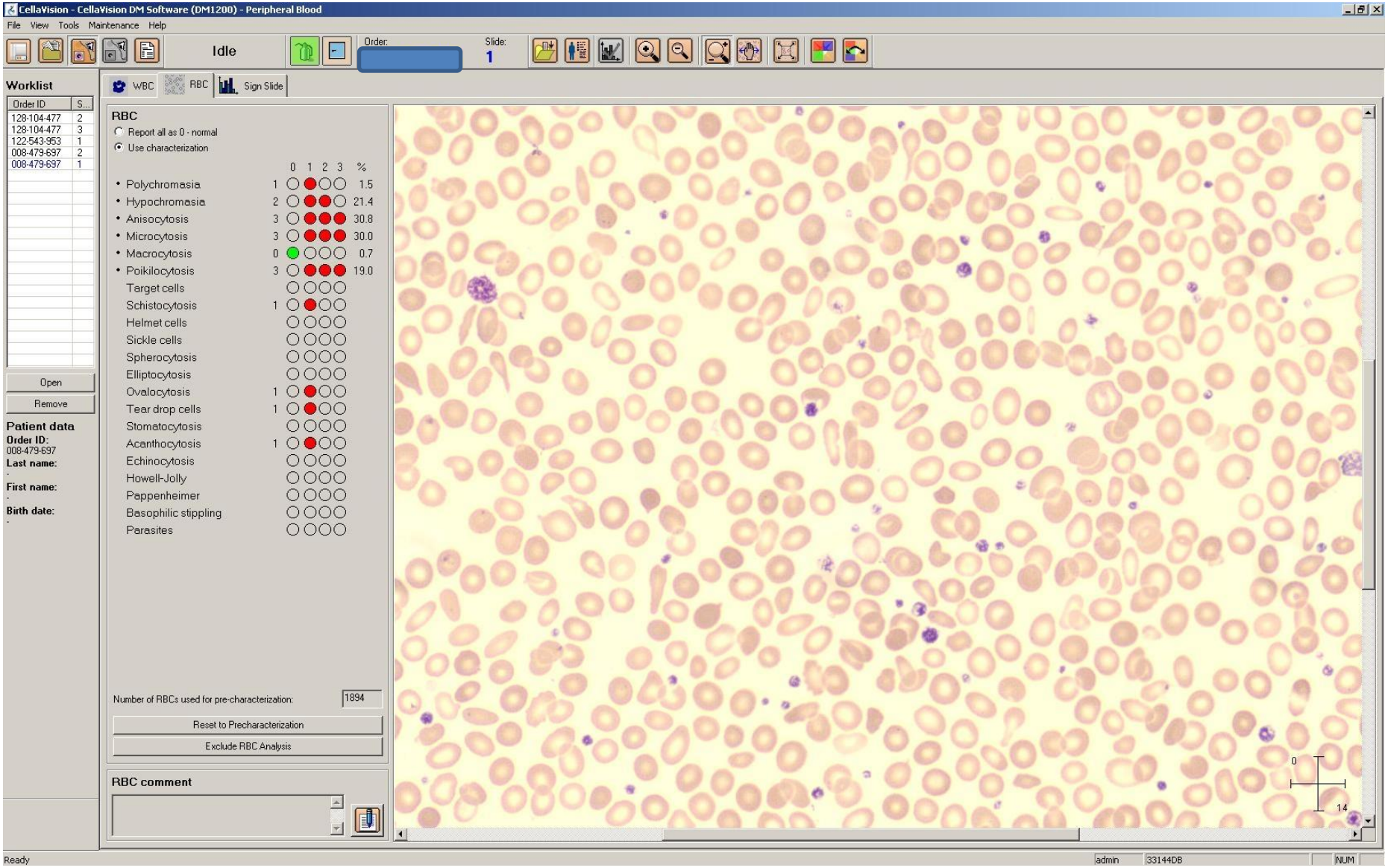
May Grünwald-Giemsa festés

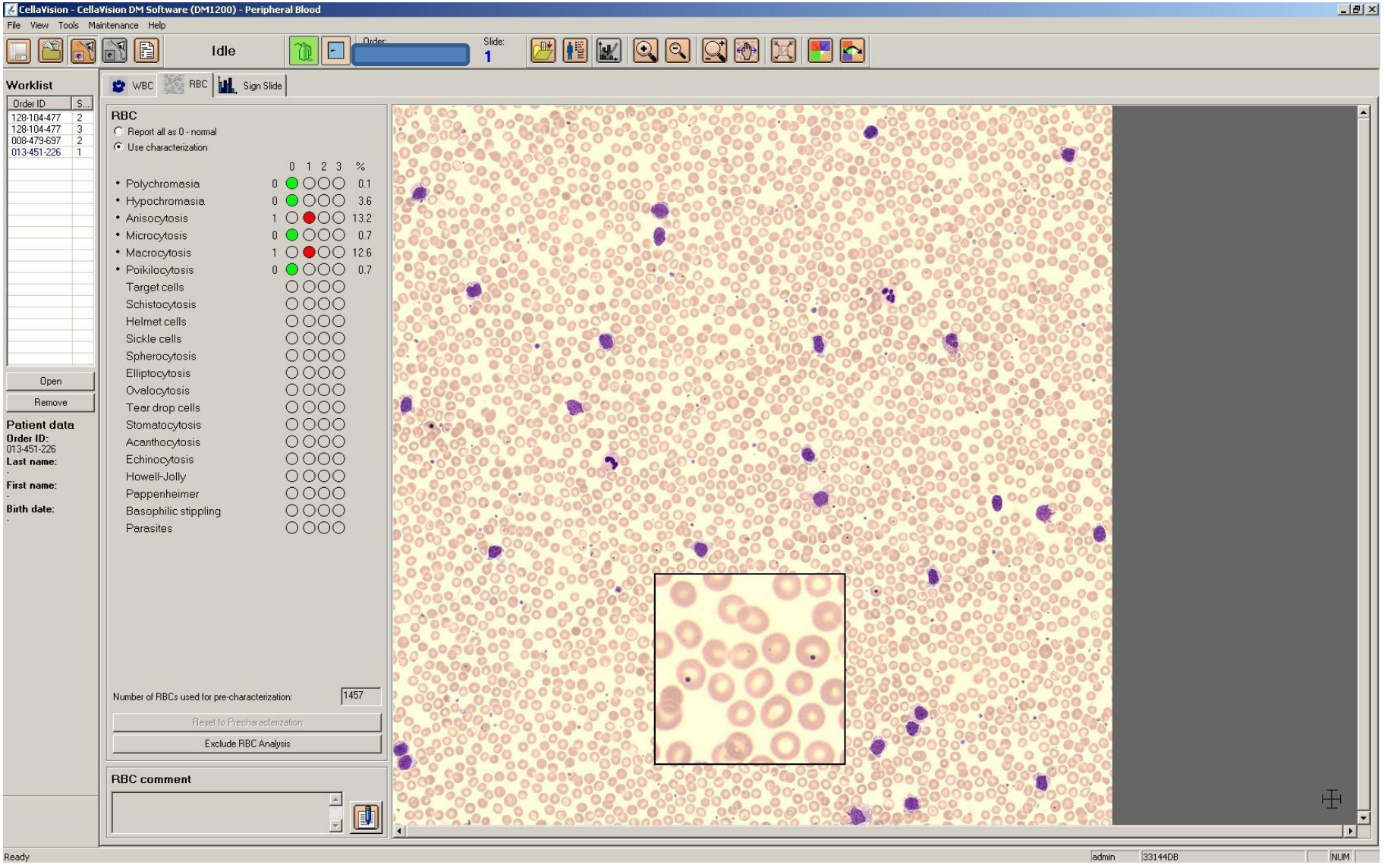
Cellavision DM1200 kenetértékelő

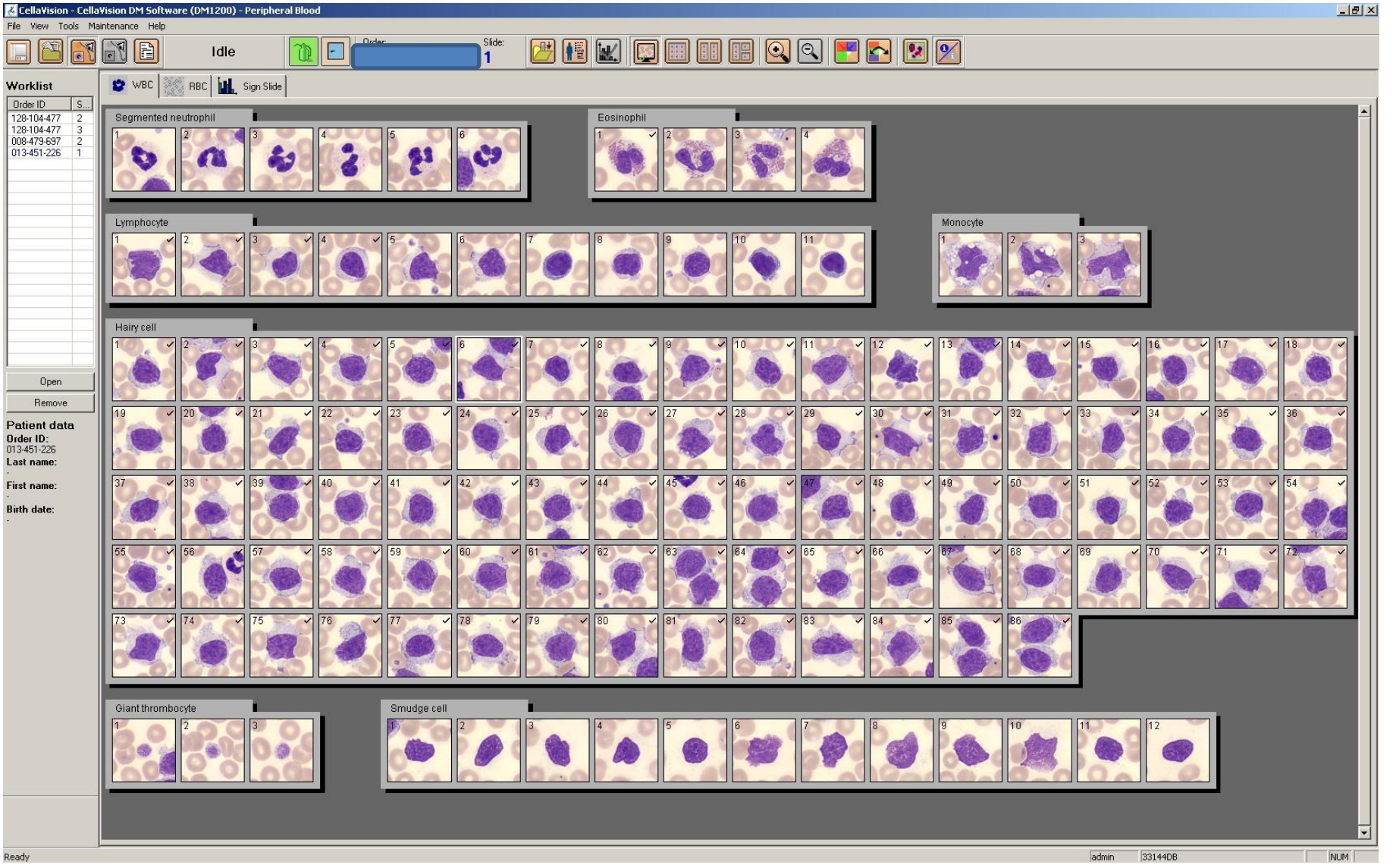


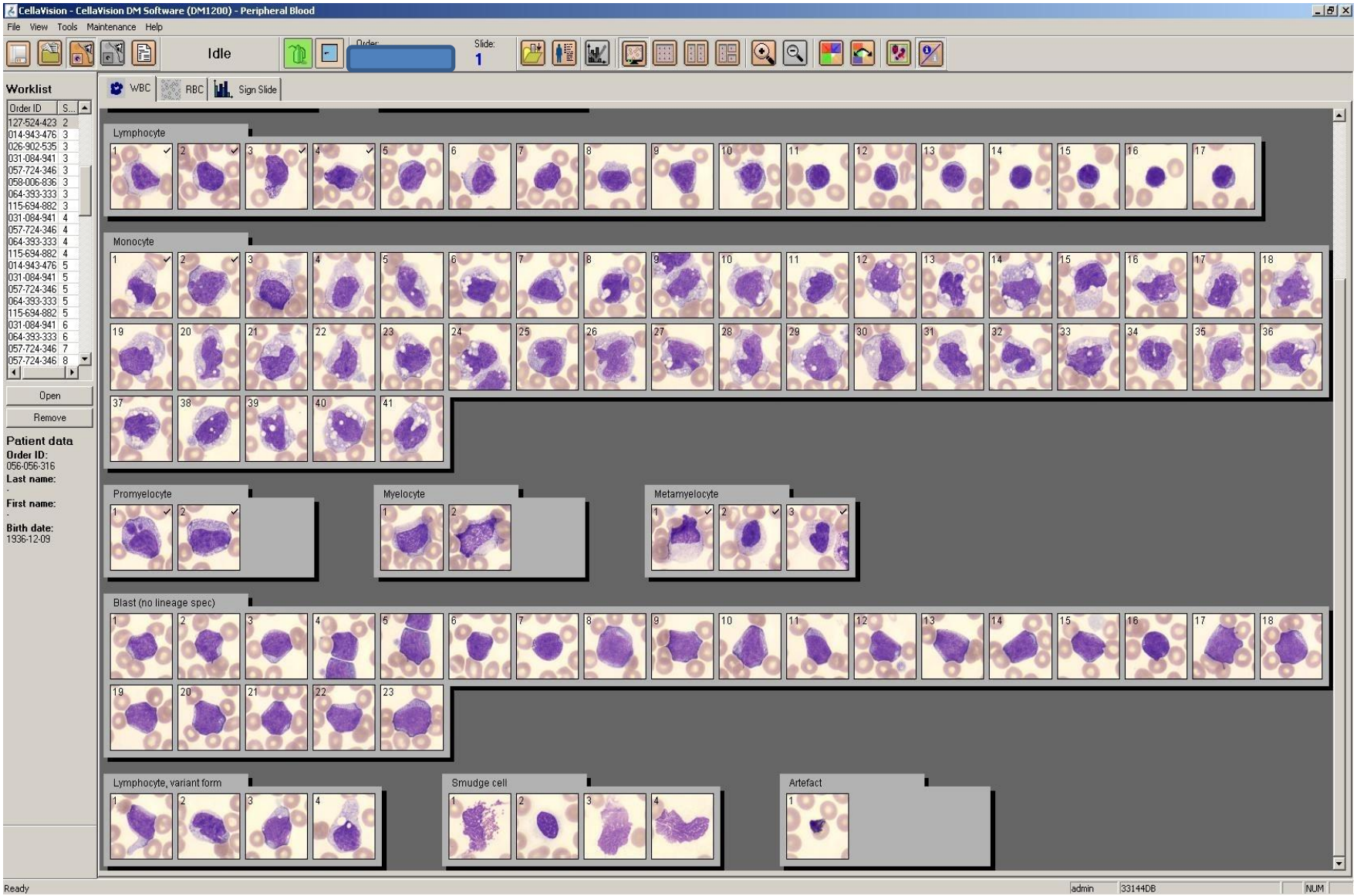
Sejtek azonosítása adatbázisban rögzített képekhez viszonyítva morfológiai paraméterek alapján


CellaVision - CellaVision DM Software (DM1200) - Peripheral Blood
File View Tools Maintenance Help
Idle
Order:
Slide:
1
Worklist
Order ID
128-104-477
128-104-477
013-451-226
064-850-964
119-492-587
119-492-587
101-456-001
121-443-678
Open
Remove
Patient data
Order ID:
121-443-678
Last name:
First name:
Birth date:
WBC
RBC
Sign Slide
Segmented neutrophil
Lymphocyte
Monocyte
Metamyelocyte
Smudge cell
Ready
admin
33144DB
NUM


CellaVision - CellaVision DM Software (DM1200) - Peripheral Blood
File View Tools Maintenance Help
Idle
Order:
Slide:
1
Worklist
Order ID
128-104-477
128-104-477
122-543-953
008-479-697
008-479-697
Open
Remove
Patient data
Order ID:
008-479-697
Last name:
First name:
Birth date:
WBC
RBC
Sign Slide
RBC
Report all as 0 - normal
Use characterization
0 1 2 3 %
Polychromasia 1 1.5
Hypochromasia 2 21.4
Anisocytosis 3 30.8
Microcytosis 3 30.0
Macrocytosis 0 0.7
Poikilocytosis 3 19.0
Target cells
Schistocytosis 1
Helmet cells
Sickle cells
Spherocytosis
Elliptocytosis
Ovalocytosis 1
Tear drop cells 1
Stomatocytosis
Acanthocytosis 1
Echinocytosis
Howell-Jolly
Pappenheimer
Basophilic stippling
Parasites
Number of RBCs used for pre-characterization:
1894
Reset to Precharacterization
Exclude RBC Analysis
RBC comment
0
14
Ready
admin
33144DB
NUM


CellaVision - CellaVision DM Software (DM1200) - Peripheral Blood
File View Tools Maintenance Help
Idle
Order:
Slide:
1
Worklist
Order ID S...
128-104-477 2
128-104-477 3
008-479-697 2
013-451-226 1
Open
Remove
Patient data
Order ID:
013-451-226
Last name:
-
First name:
-
Birth date:
-
WBC RBC Sign Slide
RBC
Report all as 0 - normal
Use characterization
0 1 2 3 %
• Polychromasia 0 0.1
• Hypochromasia 0 3.6
• Anisocytosis 1 13.2
• Microcytosis 0 0.7
• Macrocytosis 1 12.6
• Poikilocytosis 0 0.7
Target cells
Schistocytosis
Helmet cells
Sickle cells
Spherocytosis
Elliptocytosis
Ovalocytosis
Tear drop cells
Stomatocytosis
Acanthocytosis
Echinocytosis
Howell-Jolly
Pappenheimer
Basophilic stippling
Parasites
Number of RBCs used for pre-characterization: 1457
Reset to Precharacterization
Exclude RBC Analysis
RBC comment
Ready
admin
33144DB
NUM


CellaVision - CellaVision DM Software (DM1200) - Peripheral Blood
File View Tools Maintenance Help
Idle
Order:
Slide:
1
Worklist
Order ID S...
128-104-477 2
128-104-477 3
008-479-697 2
013-451-226 1
Open
Remove
Patient data
Order ID:
013-451-226
Last name:
First name:
Birth date:
WBC
RBC
Sign Slide
Segmented neutrophil
Eosinophil
Lymphocyte
Monocyte
Hairy cell
Giant thrombocyte
Smudge cell
Ready
admin
33144DB
NUM


CellaVision - CellaVision DM Software (DM1200) - Peripheral Blood
File View Tools Maintenance Help
Idle
Order:
Slide:
1
Worklist
Order ID
Open
Remove
Patient data
Order ID:
056-056-316
Last name:
First name:
Birth date:
1936-12-09
WBC
RBC
Sign Slide
Lymphocyte
Monocyte
Promyelocyte
Myelocyte
Metamyelocyte
Blast (no lineage spec)
Lymphocyte, variant form
Smudge cell
Artefact
Ready
admin
33144DB
NUM

Original Article
Diagnostic Hematology
Ann Lab Med 2019;39:141-149
https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.2.141
ISSN 2234-3806 eISSN 2234-3814

ANNALS OF LABORATORY MEDICINE

Development of a Novel Flow Cytometry-Based System for White Blood Cell Differential Counts: 10-color LeukoDiff

Dongjin Park, M.D.[1], Jiyoung Chang, M.D.[1], Jimin Kahng, M.D.[1], Hunhee Park, Ph.D.[2], Irene Jo, M.D.[1], Yonggoo Kim, M.D.[1], and Kyungja Han, M.D.[1]

[1]Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea; [2]Department of Clinical Laboratory Science, Ansan University, Ansan, Korea

Flow cytometria!

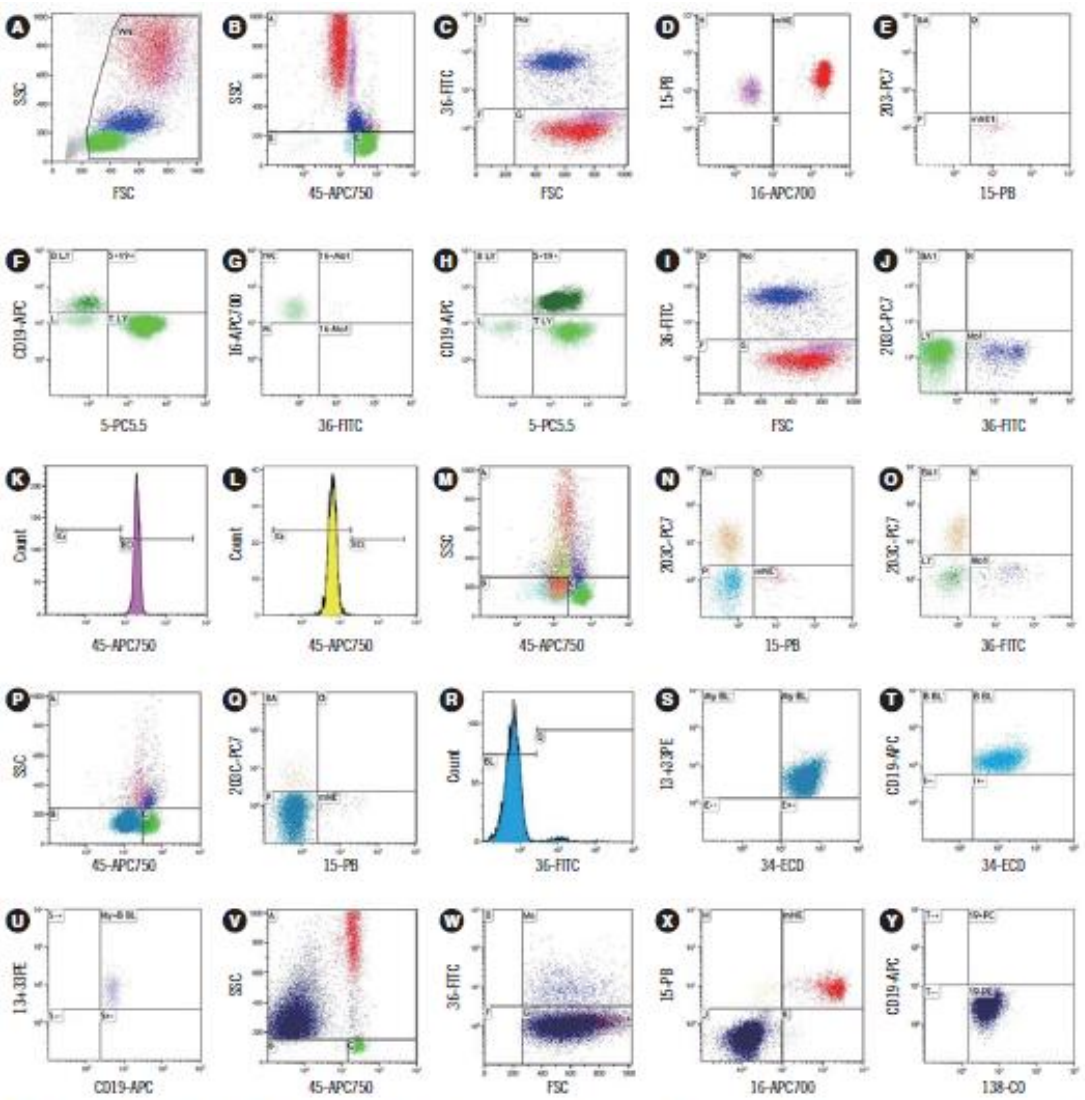
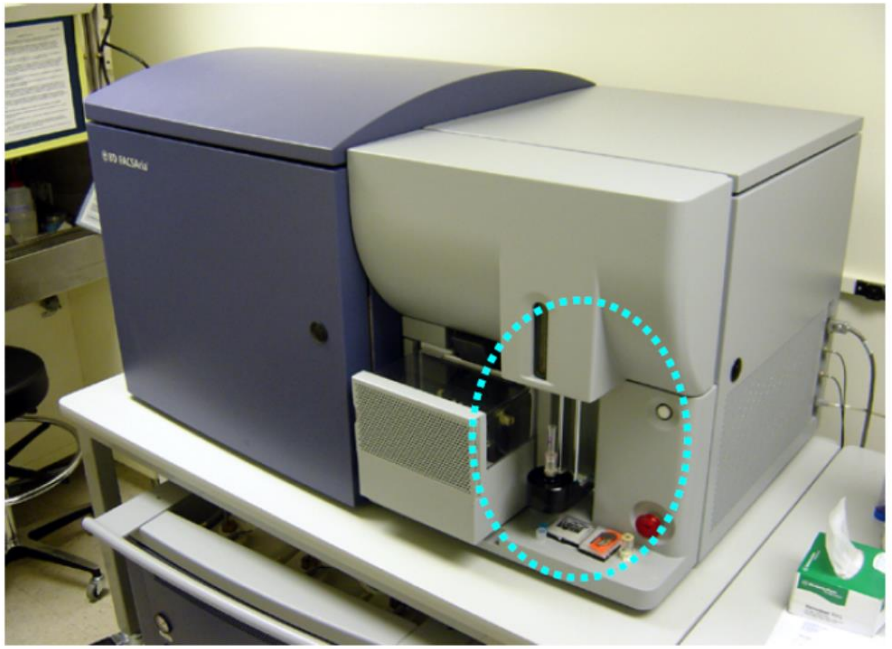


Fig. 1. 10-color LeukoDiff plots of whole nucleated cell (WN) (A), orientating gate (B), neutrophils (C, D, and E), lymphocytes (T, B, NK, 5+ 19+) (F, G, and H), monocytes (I and J), eosinophils (K), immature granulocytes (L), chronic myelogeneous leukemia (M), basophils (N and O), acute myeloid leukemia (P), blasts (Q and R), myeloblasts (S), B blasts (T), myeloid antigen-positive B blasts (U), and 19-plasma cells (V, W, X, and Y) in peripheral blood samples.
Abbreviation: NK, natural killer cells.

Áramlási citométerek



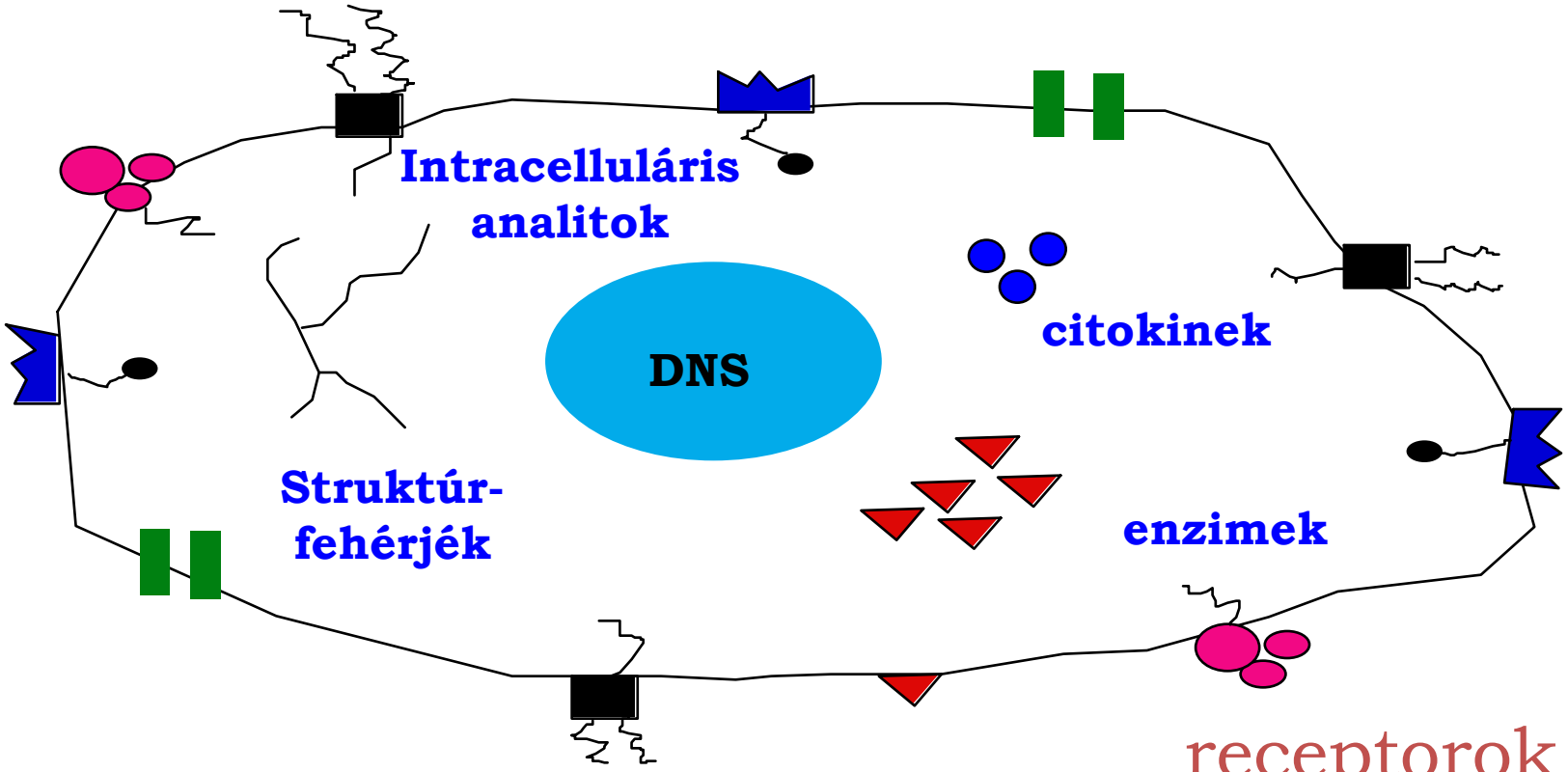








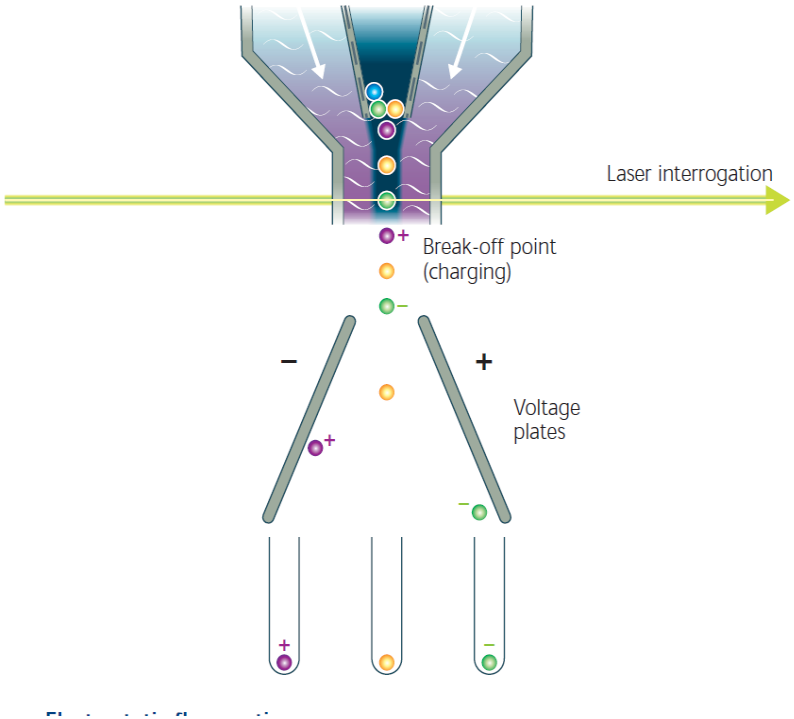
MIRE JÓ? - Mit lehet mérni vele?



Adhéziós fehérjék

**Solubilis
faktorok**

Áramlási citometria



A vizsgálandó sejtek **fluoreszcens festékkel konjugált monoklonális antitestek**kel jelölt szuszpenzióját egy zárt, a mintát körkörösen körbefogó köpenyfolyadék segítségével egy kapilláris alakú mérőcella szűk nyílásába koncentrálja

Hidrodinamikai fókuszálás biztosítja, hogy a sejtek egymás után, egyesével jussanak a mérőcellába

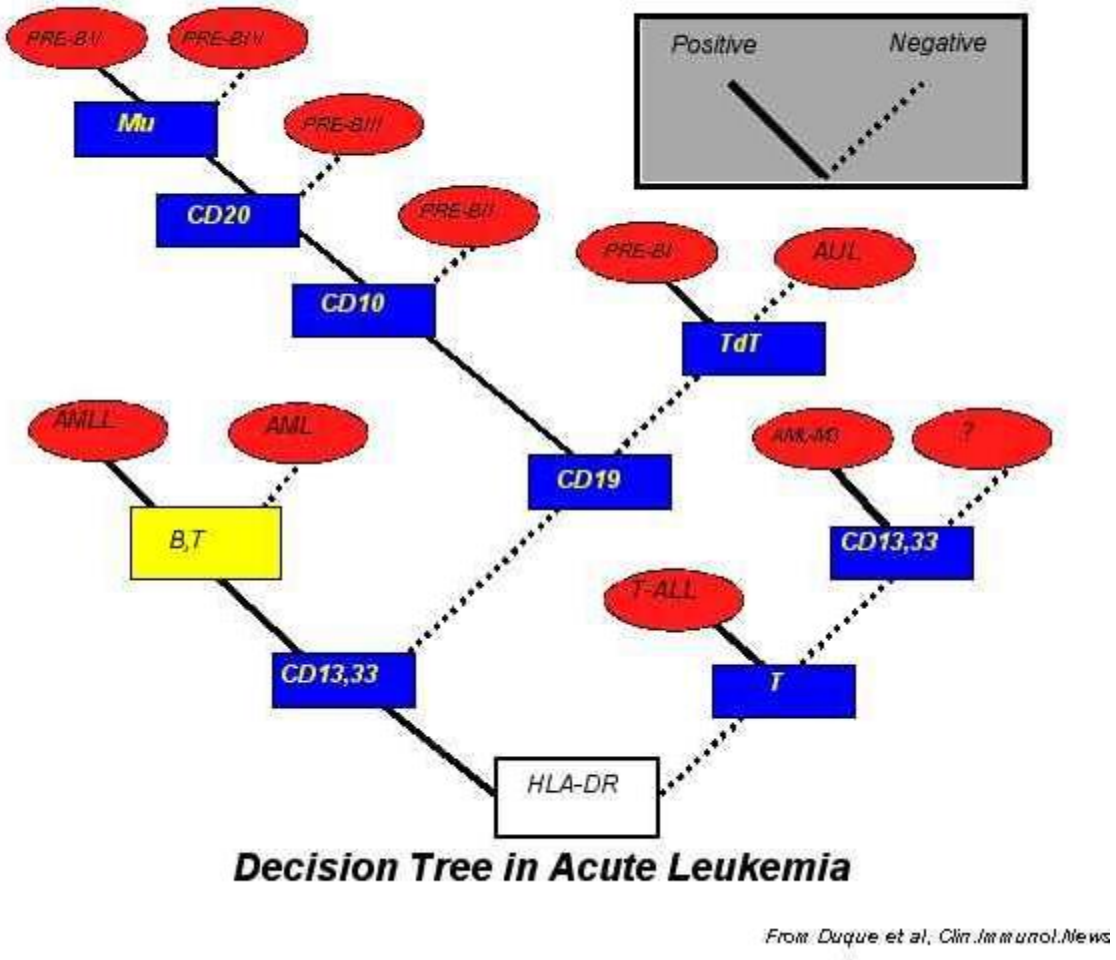
Itt a sejtek áthaladnak egy gerjesztő lézernyalábon

Detektálás fotódiódákkal vagy fotomultiplier érzékelővel

1. Előre irányuló fényszórás jel (FSC) erőssége arányos a **sejt méretével, alakjával**
2. Oldalirányú, 90°-os fényszórás jel (SSC) a **sejtek granuláltságával, optikai sűrűségével** arányos
3. A lézergerjesztett fluoreszcencia jelből több **különböző fluorokrómmal jelölt** molekulaféleséggel kapcsolatban gyűjthetők adatok

Felhőképek, hisztogramok

Leukémia-diagnosztika



Decision Tree in Acute Leukemia

From Duque et al, Clin.Immunol.News

- Sejtfelszíni és intracitoplazmatikus markerek detektálása
- Sejtvonalakra és a sejt érési fázisára specifikus **CD** (cluster of Differentation) azonosítása a patológiás sejteken fluoreszcens festékkel

pl. FITZ:fluoreszcein- izotiocianát; PE:fikoeritin

CD elemzéssel

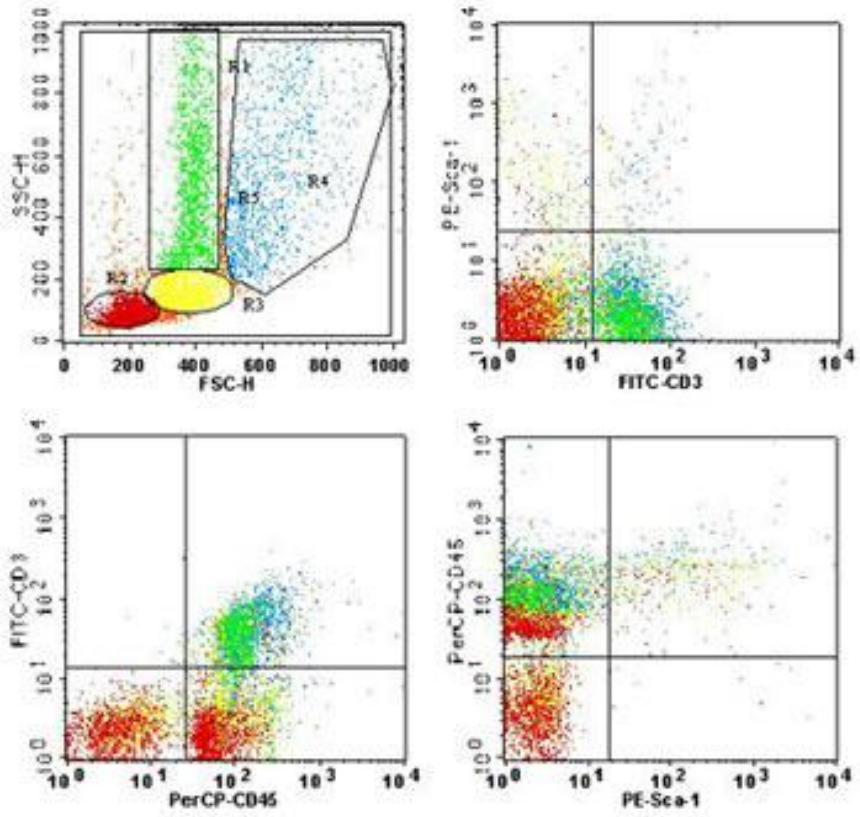
- Limfoid populáción belül T, B, NK sejtek aránya
- CD4+/CD8+ T sejtek aránya
- Monociták, granulociták aránya
- Vannak-e blasztok, milyen %-ban (CD34+ és/vagy csökkent CD45+)

Immunfenotipizálás

⇒ igen hatékonyan különíti el a mieloid és limfoid vonalakat akut leukaemiák és minimálisan differenciált leukaemiák esetében

⇒ terápiarezisztens leukaemiák azonosítására is alkalmazható

⇒ ALL-ben a fenotípus szoros korrelációt mutat a kimenetellel



COMBINATION POPULATION IDENTIFIED

CD4+/CDw29+ Helper/effector, more mature memory cells

CD4+/CD45R+ Suppressor inducer, less mature non-memory cells

CD4+/Leu8+ Suppressor inducer, some helper function

CD4+/Class II MHC Activated cells, immature cells

CD4+/CD25+ Activated cells (IL2 receptor)

CD4+CD38+ Immature cells, activated cells

CD8+/CD11b+ Of the CD11b+ cells the suppressors are bright CD8+ and NK are dim

CD8+ CD8+/CD28+ Cytotoxic precursor/effector cells

CD8+/CD57+ Cytotoxic function

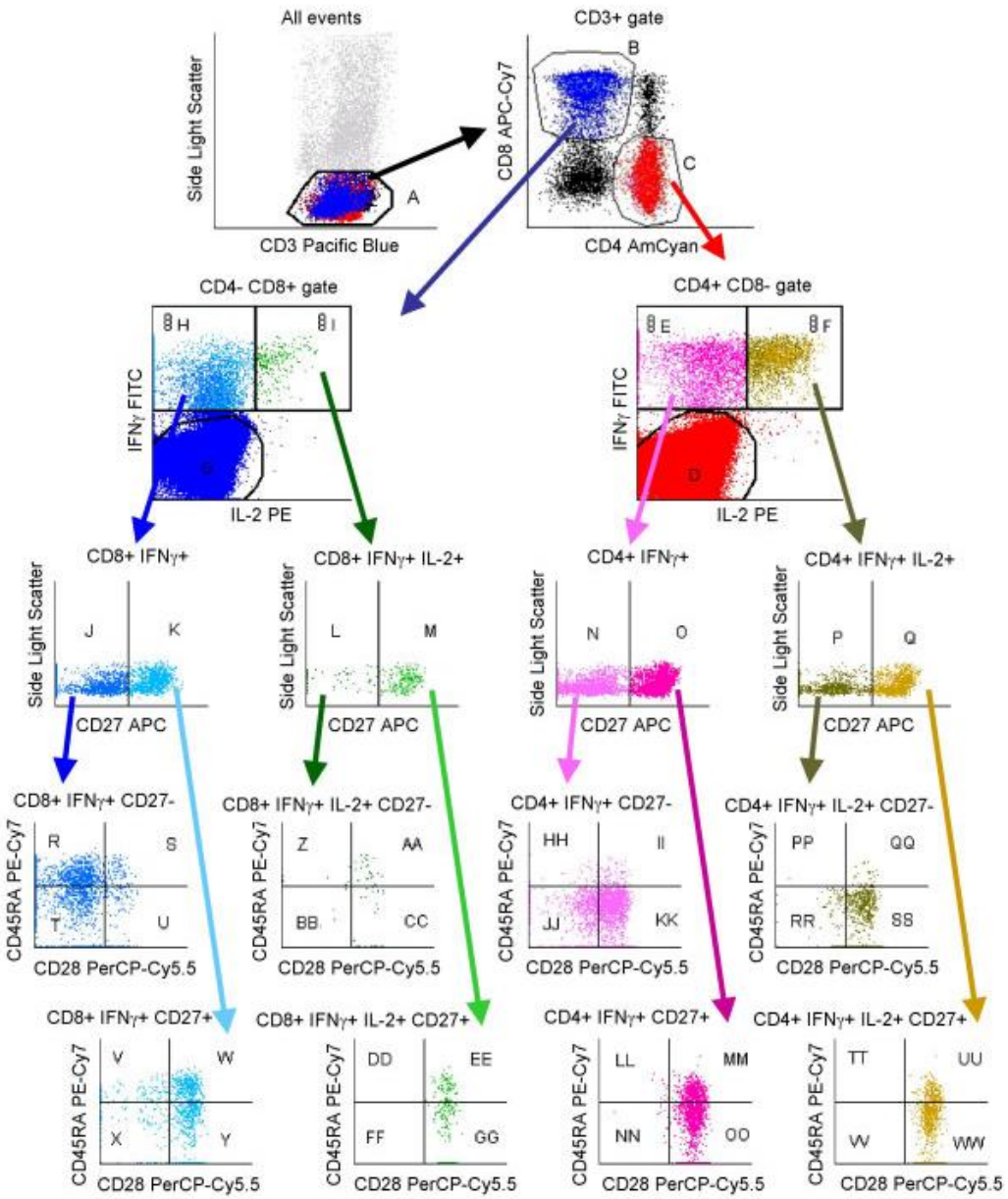
CD8+/Class II MHC+ Activated cells, immature cells

CD8+/CD25+ Activated cells (IL2 receptor)

CD8+/CD38+ Immature cells, activated cells

CD16+/CD57+ Low NK activity

CD16+/CD56+ Most potent NK activity

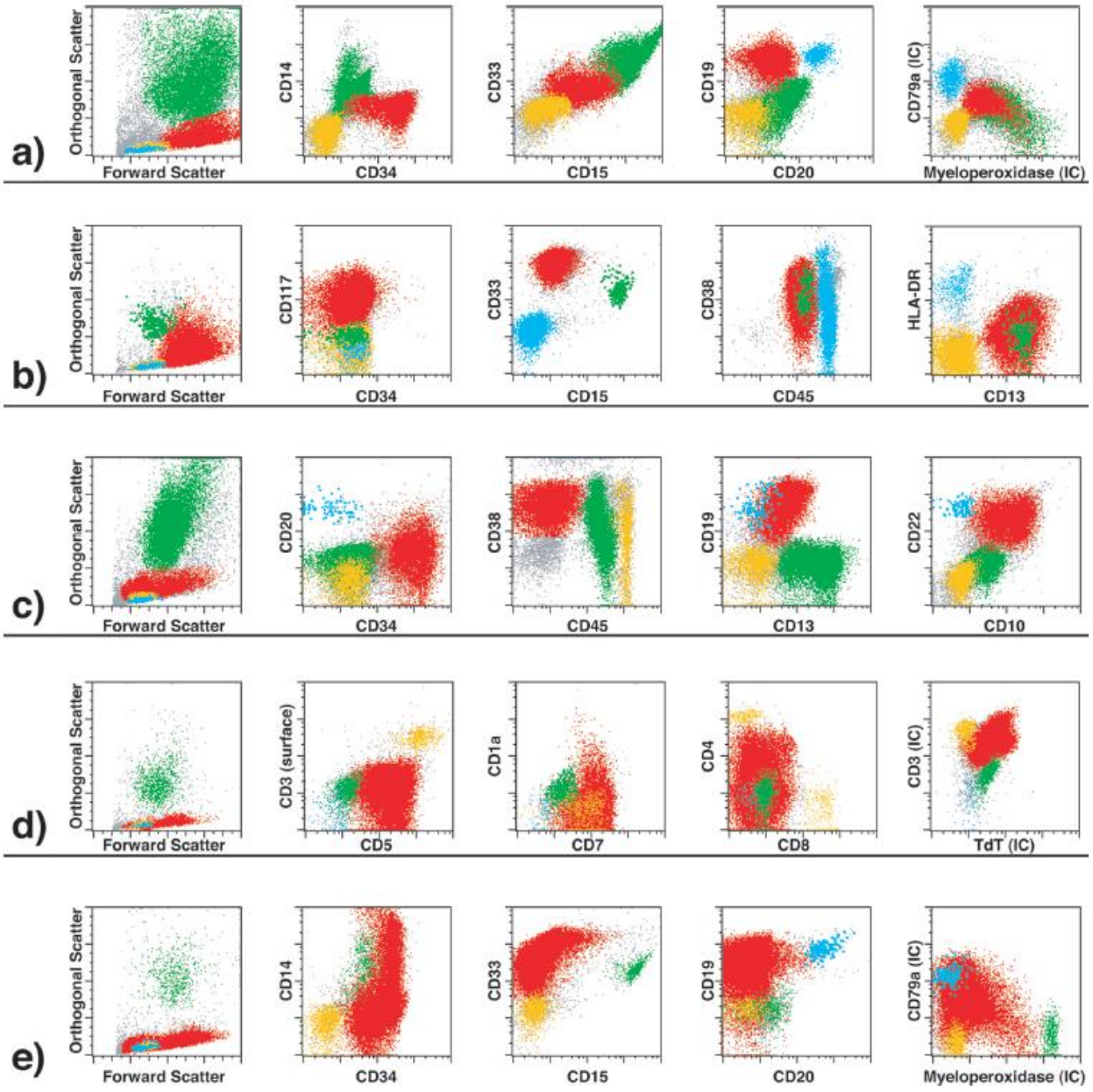


Intracelluláris festés – sejtfelszíni marker kombinálása

Az akut leukémiák diagnosztikájában az elsődleges cél:

- Blasztok jellemzése
  - Érettség
  - Sejtvonal
  - Kóros markerexpressziók

A karakterizálás lehetővé teszi a leukémiás sejtek célzott keresését kezelést követően

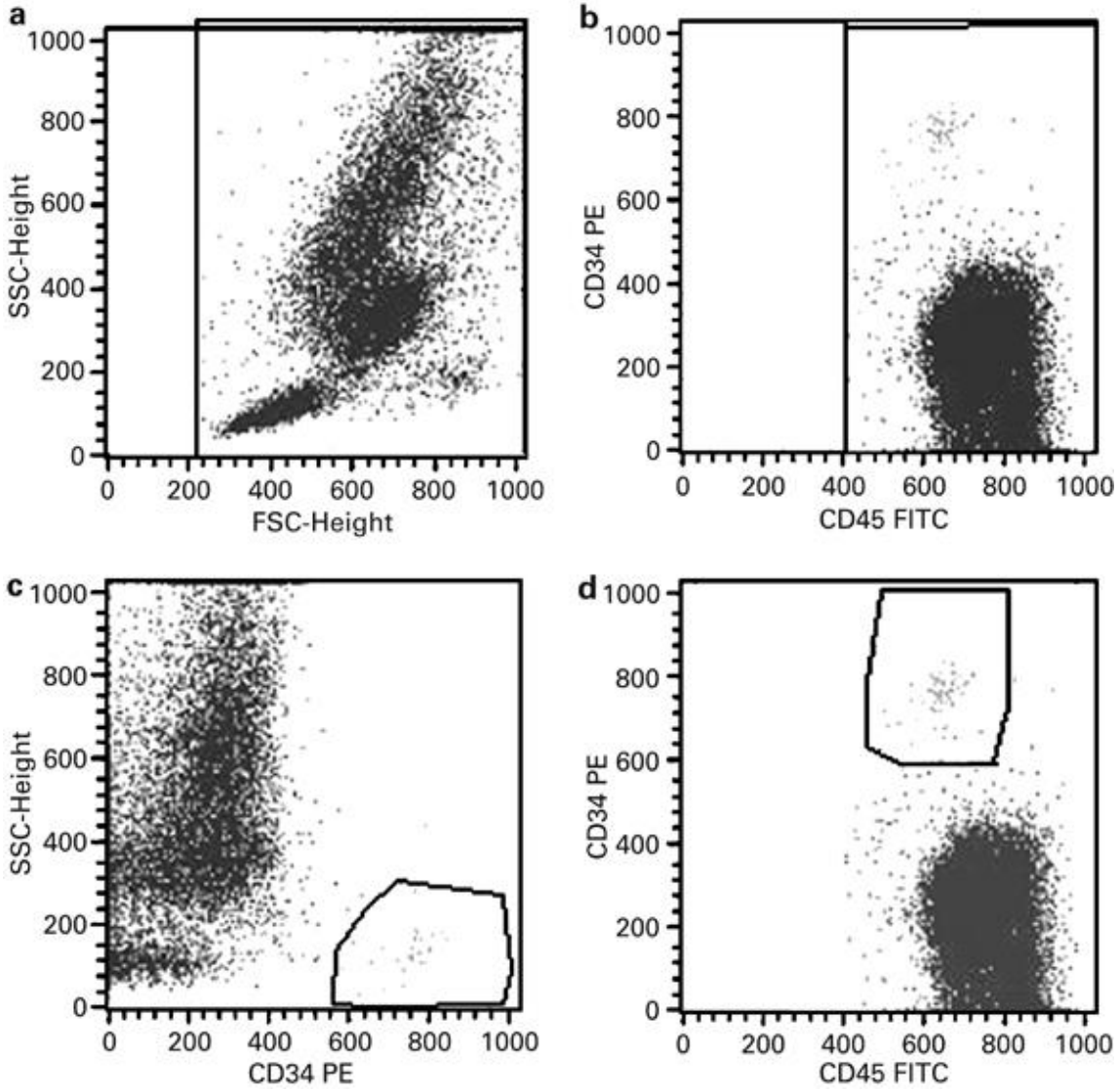


a, Acute myeloid leukemia with expression of CD34, CD15, CD33, and myeloperoxidase. These features suggest a possible recurrent t(8;21)(q22;q22), which was later confirmed by cytogenetic analysis.
b, CD13+, CD33+, CD117+ acute myeloid leukemia with minimal expression of CD34 and HLA-DR. In addition, the blasts show increased orthogonal (side) scatter, suggestive of cytoplasmic complexity/granularity.
As predicted, cytogenetic fluorescence in situ hybridization studies performed on the remaining specimen showed the recurrent t(15;17)(q22;q12) of acute promyelocytic leukemia.
c, B-lymphoblastic leukemia that is CD34+, 19+, 22+, and CD10+. Aberrancies in comparison to normal B-lymphoid precursors include the partial loss of CD45 and gain of the myeloid antigen CD13.
d, T-lymphoblastic leukemia, which is dim to negative for surface CD3 (second plot) but positive for intracellular CD3 and TdT (fifth plot).
e, Acute leukemia with expression of multiple myeloid antigens including CD14, CD33, and most significantly myeloperoxidase, as well as multiple B-lymphoid markers including CD19 and CD79a. This neoplasm also expressed myeloid-associated CD36 and CD64 and B-lymphoid associated CD22. No cytogenetic abnormalities were identified; hence, this case is best classified as a mixed phenotype acute leukemia

Neoplasztikus populáció:piros; granulocita:zöld; h.kék:B limfocita; sárga:T limfociták

Arch Pathol Lab Med—Vol 135, January 2011

Őssejtek kimutatása



CD34+ őssejtek

- Leukémiában nő
- Irradiációs kezelést követően az őssejtszám normalizálódásának a monitorozása
- Őssejt mobilizálás sikere

(normál esetben periférián gyakorlatilag nincs;

Csontvelőben <5%)

Egyéb analízis lehetőségek

Limfómákban

- T-sejt klonalitás definitív diagnosztikájára,
- vékonytű-aspirátumokból a limfóma fenotipizálására, illetve a minimális reziduális betegség kimutatására a kóros mintázatú antigénexpresszió alapján

(nem javasolt Hodgkin-limfóma, krónikus mieloid leukémia vagy myelodysplasiás szindróma kórismézésére; esetleg az utóbbi két kórképben a betegség progressziójának monitorozásában)

Neutropéniában

- pontosan azonosíthatja a granulocita-specifikus alloantitesteket (autoimmun kórképekben pl. Felty-szindróma, szisztémás lupus erythematosus, Hashimoto-thyreoiditis)
- Immun eredetű kórállapotokban kimutathatja a neutrofil sejtekkel szembeni antitesteket, illetve igazolhatja a neutropénia eredetét – ily módon esetenként feleslegessé téve a csontvelő vizsgálatát.

A leukocyták funkcionális deficienciáinak elemzése

- pl. neutrofil adhéziós molekulák meghatározása (I-es típusú leukocita-adhéziós deficiencia szindróma kórismézésében)

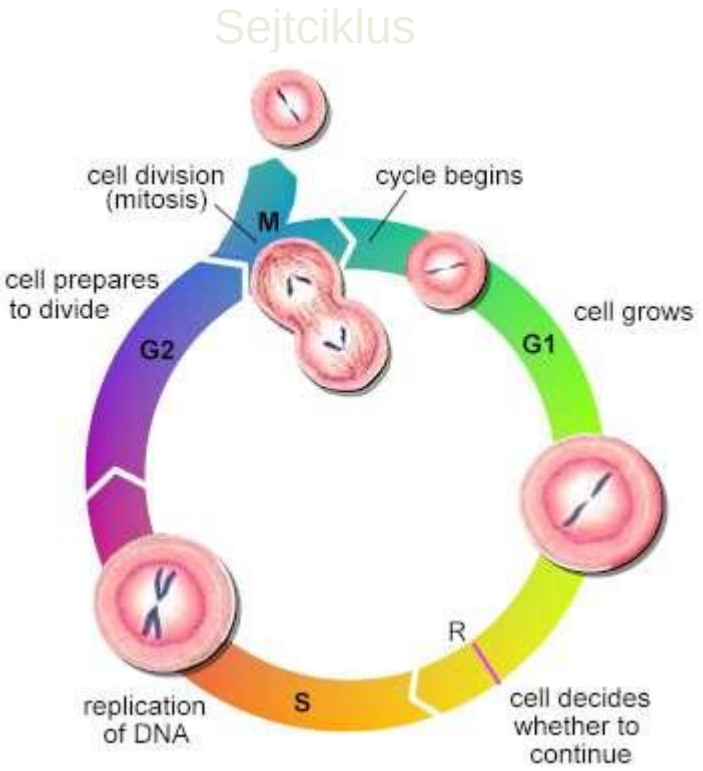
Azonosíthatók azok a neutrofil sejtek, melyekből hiányzik a CD11/CD8 antigén komplex

Sejtciklus elemzése

DNS próbák

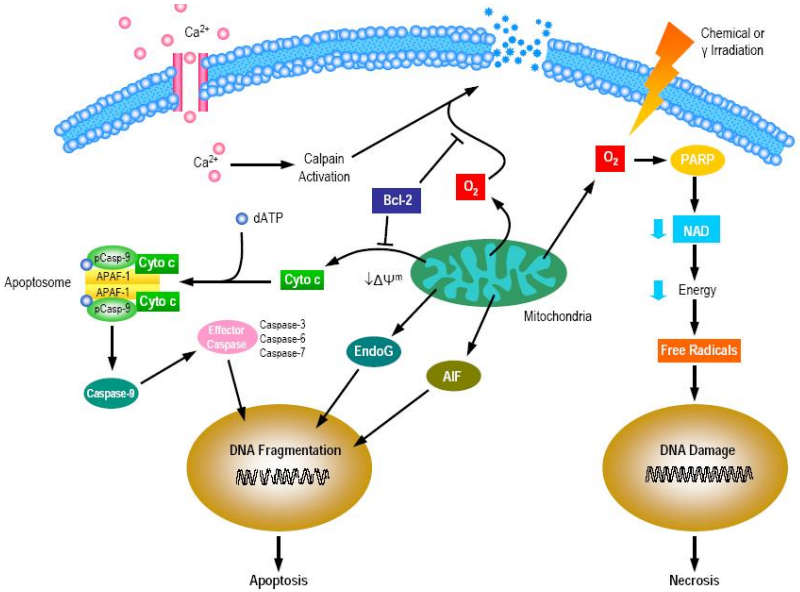
DAPI	}	
Hoechst	}	UV
Propidium iodide (PI)	}	
7-AAD	}	488
TOPRO-3	}	
DRAQ5	}	633

Kötött molekulák száma megfelel a sejtben lévő DNS-molekulák számának



Sejtciklus során a sejt *mérete és DNS-tartalma* változik

Apoptózis

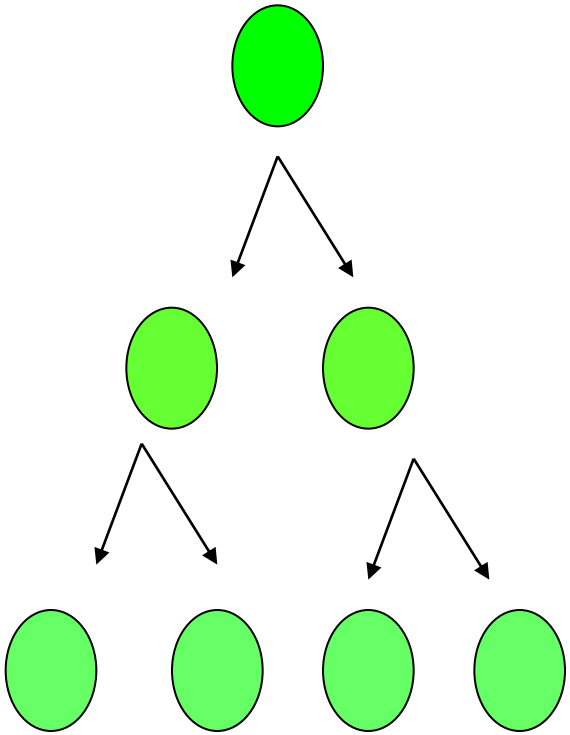


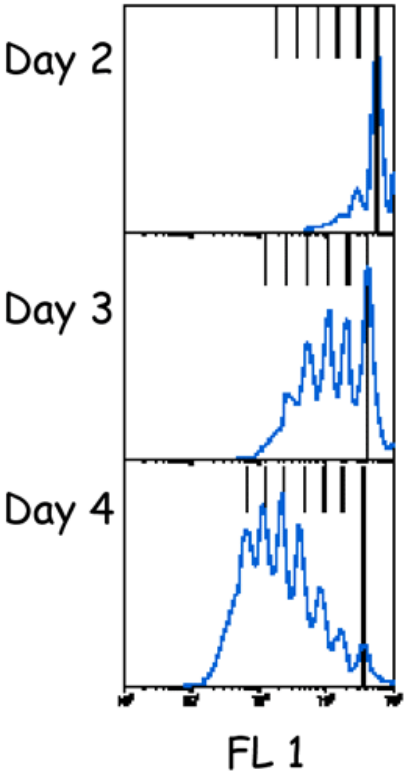
FACS-szal mérhető:

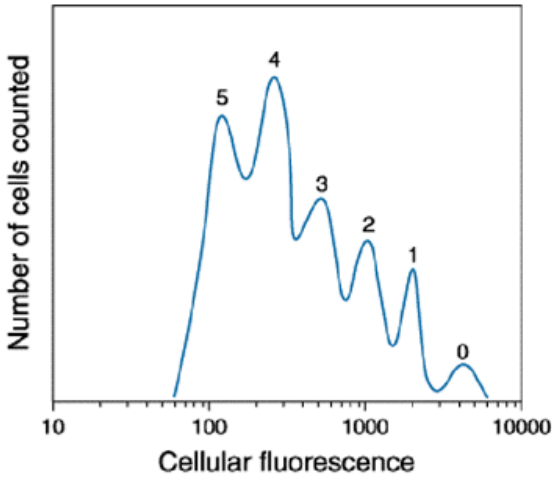
- DNS-fragmentek
- Membránstruktúra és –integritás (Annexin-V, PI)
- Mitokondrium-funkció (Mitotracker Red)
- Kaszpáz aktivitás (ellenanyagokkal)

Sejtproliferáció vizsgálata

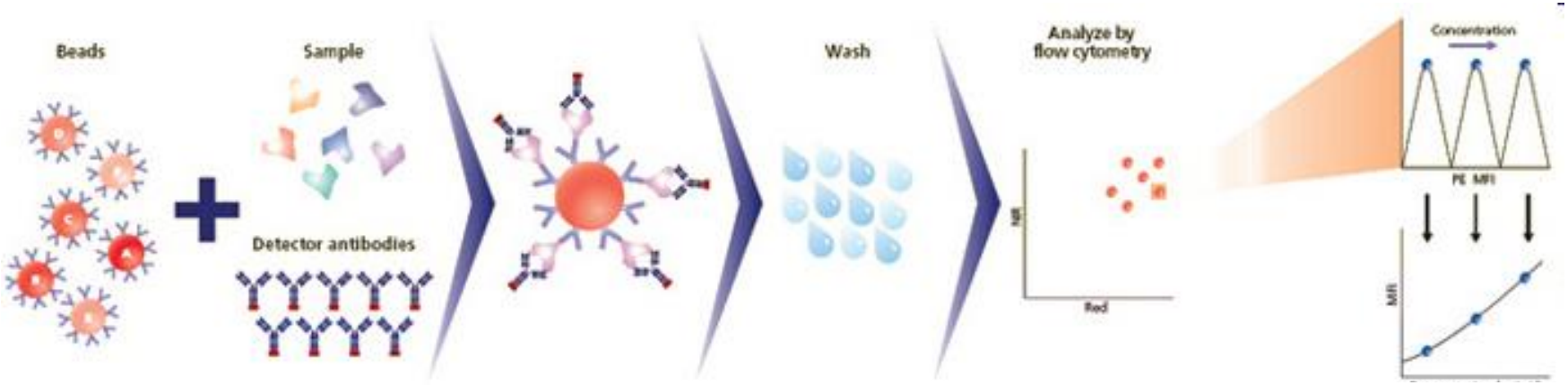
CFSE-festés

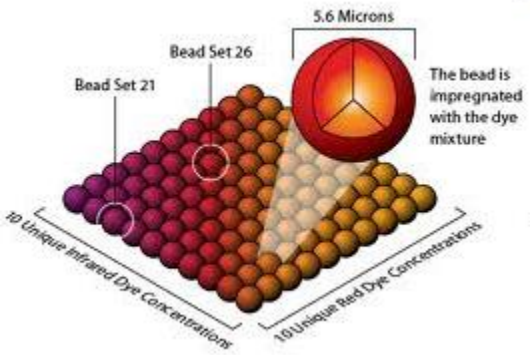






Solubilis paraméterek (citokinszintek) mérése







Trombocita-analízis

- Autoimmun trombocitopéniás purpurárában a trombocitához kötött antitestek jelenléte kimutatható, analizálható
- Alloantitest-képződés esetén a szérumban antitestek mutathatók ki anélkül, hogy trombocita-asszociált antitestek lennének jelen.

- Számos primer trombocitopátia patogenezise és molekuláris defektusai jól ismertek, és összefüggést mutatnak a strukturális és funkcionális glikoprotein-defektusokkal
  - gpIIb/IIIa kóros expressziója Glanzmann-thrombastheniában
  - gpIb defektusa Bernard−Soulier-betegségben

- A thrombocyta-aktiváció funkcionális analízise egészen a közelmúltig elsődlegesen a tudományos kutatások terepe volt, holott a thrombocyta-aktivációnak klinikai relevanciája is lehet kardiopulmonális bypass és renális dialízis után, valamint a myocardialis infarktuson vagy thromboticus eseményen átesett betegek kezelésében

Vörösvértest-analízis

- **Foetomaternalis transzfúzió gyanúja** => az anyai vért elemzik magzati vörösvérsejtek kimutatására, illetve azok mennyiségi meghatározására, és az eredményeknek megfelelő mennyiségű Rh-immunglobulint alkalmaznak
  - A rhesus (d) antigénnel szembeni, fluoreszcens jelölésű antitestek, illetve újabban hemoglobin F elleni antitestek használhatók a vizsgálatokhoz
  - **A hbF intracelluláris** kimutatása – mely a vörösvértestek membránjának permeabilizációját, illetve a humán hemoglobin F gamma-lánca elleni antitestet alkalmaz
  - A módszer alkalmas arra, hogy a magzati sejteket elkülöníthessük az F-sejtektől (hemoglobin F-et kis mennyiségben tartalmazó felnőtt vörösvértestek).

- A **paroxizmális nokturnális haemoglobinuria** (szerzett klonális őssejtrendellenesség)
  - a glikozil-foszfatidil-inozitol bioszintézisének zavara hozza létre, melynek feladata, hogy a komplement- és immunregulátor felszíni proteineket lehorgonyozza a vörösvértesteken, monocytákon, neutrophil sejteken, lymphocytákon és thrombocytákon.
  - Erythrocyták esetében a fellépő zavar következtében a sejtek érzékenyebbé válnak a komplementmediált lízis hatásai iránt=> intravaszkuláris haemolysis
  - A CD55-tel és CD59-cel szembeni antitestekkel felállítható a PNH definitív diagnózisa

- (reticulocita-mérés)

Minta

Csontvelő: legalább 3 ml javasolt.

Heparinos fecskendőbe való vétel esetén: azonnal a laborba küldeni (20-25°C)

Éjszakára: RPMI oldatba kell tenni és hűteni

Perifériás vérminta (20-25°C)

ACD (72 óra)

Na Heparin (48 óra)

K2-K3EDTA (30 óra)

Szövet (2–8°C)

apró darabokra vágva 20%-os RPMI oldatba (24 óra),

Fiz.sót kerülni kell (kivéve, ha azonnal feldolgozzák).

Fixálni tilos

Testfolyadék (RPMI oldatba kell tenni és hűteni) 24 óra

Liquor (CSF): sterilen kell venni; (2-8°C) azonnal a laborba kell vinni