

Možnosti uplatnenia prietokovej cytometrie pomocou FACS

Skratka FACS je označenie pre fluorescence activated cell sorting. Ide o špeciálny typ prietokovej cytometrie, pri ktorej môžu byť merané a analyzované fluorescenčne označené bunky. Bunky sa pohybujú v prúde tekutiny cez laserový lúč, pričom sa určuje veľkosť bunky, vnútorná štruktúra a relatívna intenzita fluorescencie. Pre mnoho typov buniek, predovšetkým lymfocytov, existujú fluorescenčne značené protilátky. Sú namierené proti imunofenotypickým povrchovým znakom (Cluster of Differentiation, v skratke „CD“) buniek. Pomocou týchto CD markerov sú bunky vyšetrované a bližšie identifikované. Napríklad cytotoxické T lymfocyty sú CD3 a CD8 pozitívne, ale CD21 a CD4 negatívne.

Toto vyšetrenie sa uplatňuje v rutinnej diagnostike hlavne v hematológii. Keďže materiál musí mať tekutú formu, vzorky krvi sú na vyšetrenie veľmi vhodné. Pre zaručenie výsledku s dobrou výpovednou hodnotou je dôležité, aby boli bunky intaktné. Preto by malo vyšetrenie prebehnúť čo najrýchlejšie, maximálne do troch dní. V Labokline sa prístroj na FACS uplatňuje pri rôznych dôležitých vyšetreniach.

1. Protilátky proti trombocytom

Vyššie množstvo imunoglobulínov (prevažne IgG) na povrchu trombocytov vedie k predčasnej fagocytóze trombocytov makrofágmi. Následkom je trombocytopenia. Táto imunitne sprostredkovaná trombocytopenia (IMT) môže byť primárna alebo sekundárna. Zriedkavá primárna forma je vyvolaná autoprotiátkami, ktoré sú namierené proti epitopom špecifickým pre trombocyty.

Naproti tomu sekundárna imunitne sprostredkovaná trombocytopenia súvisí s rôznymi liečivami, infekčnými pôvodcami

(baktériami, vírusmi, prvokmi, helmintmi), neopláziami a inými imunitne sprostredkovanými ochoreniami.

Primárnu IMT pozorujeme najmä u psov, dvakrát častejšie u samíc ako u samcov, vo všetkých vekových kategóriách, ale najčastejšie u zvierat stredného veku. Predisponovanými plemenami sú kokeršpaniel, miniatúrny a toy pudel, staroanglický ovčiak (bobtail), zlatý retríver, ako aj nemecký ovčiak.

Nameraný počet trombocytov je spravidla pri primárnej IMT s menej ako 30G/l výrazne nižší ako pri sekundárnej forme.

Diagnostika prostredníctvom FACS sa uskutočňuje pomocou dôkazu protilátok proti trombocytom. IgG protilátky naviazané na trombocytoch sa dokazujú po dvojitej inkubácii. Hladina protilátok <15% sa považuje za negatívnu, zatiaľ čo >30% je hodnotená ako pozitívny dôkaz IMT. Aby sa docielilo dobre vyhodnotiteľné imunofarbenie, vzorka (EDTA plná krv) nesmie byť staršia ako 3 dni. Vyšetrenie sa musí realizovať pred zahájením imunosupresívnej terapie, inak môže dôjsť k falošne negatívnym výsledkom. Ďalšími diagnostickými možnosťami sú diagnostická terapia kortikoidmi alebo dôkaz megakaryocytárnej hyperplázie v kostnej dreni.

2. Bunkový imunitný status

Bunkový imunitný status zahŕňa veľký krvný obraz, ako aj stanovenie relatívneho a absolútneho počtu periférnych lymfocytov: B-buniek, T-buniek celkovo, CD4+ (T- pomocných buniek) a CD8+ buniek (cytotoxických T-buniek).

Imunofenotypizácia krvi spočíva v selektívnom rozpoznaní povrchových antigénov buniek pomocou monoklonálnych protilátok ozna-

čených fluorescenčným farbivom prostredníctvom prietokovej cytometrie FACS. Vyšetrenie statusu bunkovej imunity je indikované vtedy, keď klinické symptómy dávajú predpoklad pre narušenie primárneho alebo sekundárneho imunitného systému.

U psov môže určenie imunitného statusu pomôcť pri diagnóze pyodermie, demodikózy, systémového lupu erythematodes, leišmaniózy, ako aj vrodených defektov T-buniek. Priebežné vyšetrenia sa môžu využiť pri medikamentóznej terapii ku kontrole a úprave dávkovania.

U koní slúži k objasneniu častých a prolonovaných infekcií.

Stanovenie imunitného statusu zohráva dôležitú úlohu pri infekcii **vírusom imunodeficiencie mačiek (FIV)**.

Vírus spôsobuje chronické perzistentné infekcie s progresívnym priebehom ochorenia. Infekciu imunokompetentných buniek dochádza postupne k vyčerpaniu imunitného systému.

Vírus sa vyznačuje výrazným tropizmom k T-lymfocytom a makrofágom. Postihnuté sú pritom predovšetkým funkcie T-lymfocytov, pričom prevládajú kvantitatívne a kvalitatívne defekty populácie pomocných T-buniek. Najprv vedie vzostup CD8+ buniek v percentuálnom poklese počtu CD4+ buniek. Počet CD8+ zostáva počas asymptomatickej fázy infekcie zvýšený a klesá až relatívne krátko pred rozvojom klinických symptómov. Na začiatku infekcie sú infikované hlavne CD4+ bunky. V nich je aj možné nájsť najväčšie množstvo vírusov. Pri postupujúcej infekcii vedie absolútny pokles CD4+ buniek k zníženiu pomeru CD4+/CD8+.

Humorálna imunitná ochrana vykazuje poruchy funkcií až relatívne neskoro. Zníženie počtu B-buniek nachádzame zväčša až vo finálnom štádiu. Množstvo vírusov krvi sa znova významne zvyšuje, k protilátkovej odpovedi však už nedochádza.

Zhotovenie imunitného statusu teda pomôže posúdiť prognózu v prípade primárnej alebo sekundárnej imunodeficiencie.

3. Diferenciácia leukémií

Pri lymfocytóze > 30 G/l resp. pri lymfoproliferatívnom ochorení potvrdenom pomocou vyšetrenia klonality (PARR) (leukémia, lymfóm V. štádia) s minimálnym počtom leukocytov 5 G/l, môžeme urobiť diferenciáciu leukémií prostredníctvom FACS. Použitím CD markera pre identifikáciu buniek môže toto vyšetrenie odlíšiť akútnu leukémiu od chronickej (CD34 marker kmeňových buniek), čo nám dáva dôležitú informáciu o prognóze a pri výbere terapie. Ďalej môžu byť neoplastické bunky rozdelené na B-bunky a T-bunky, ako aj podtypy lymfocytov.

Diferenciácia myeloidných leukémií pomocou FACS bola medzičasom etablovaná aj v Labokline a môže byť použitá najmä pri výskyte atypických blastov alebo monocytárných buniek. Diagnóza akútnej myeloidnej leukémie sa tiež stanovuje pomocou markera CD34. Podobne ako pri lymfatickej forme musíme aj pri akútnej myeloidnej leukémii stanoviť zlú prognózu (<6 mesiacov). Keďže vyšetrenie klonality sa obmedzuje na lymfoproliferatívne ochorenia, diferenciácia leukémií pomocou FACS je jedinou menej invazívnou možnosťou vyšetrenia myeloidných leukémií.

Avšak pri tzv. leukemoidných zápalových reakciách, ktoré pozostávajú z výrazného posunu doľava, neutrofilie a monocytózy, s celkovým počtom leukocytov >50 G/l, je dôležité najprv klinické vyšetrenie na identifikovanie príp. pyogénnych infekcií (napr. pyotorax, pyometra, peritonitída), imunitne sprostredkovaných ochorení (napr. glomerulonefritída, IMHA), neoplázií, nekrózy tkanív alebo hyperestrogenizmu.