

Možnosti využití průtokové cytometrie prostřednictvím FACS

Zkratka **FACS** znamená fluorescence-activated cell sorting. Jedná se přitom o zvláštní metodu průtokové cytometrie, při které mohou být fluoresceinem značené buňky změřeny a analyzovány. Buňky proudí tekutinou skrz laserový paprsek a přitom je zaznamenána jejich velikost, vnitřní struktura a relativní intenzita fluorescence. Pro různé typy buněk, obzvláště pro lymfocyty, existují různé typy fluoresceinem značené protilátky, které jsou namířeny proti určitému imunofenotypickému znaku na buněčném povrchu (Cluster of Differentiation, zkráceno 'CD'). Pomocí tohoto markeru mohou být buňky blíže vyšetřeny a identifikovány. Například cytotoxické T-lymfocyty jsou identifikovány jako CD3 a CD8 pozitivní, ale CD21 a CD4 negativní.

Toto vyšetření je prováděno v běžné diagnostice, obzvláště pak v hematologii. Vzhledem k tomu, že vyšetřovaný materiál musí být v tekutém stavu, jsou vzorky krve zvláště výhodné. K zaručení vypovídajícího výsledku je důležité, aby byly buňky intaktní. Proto by mělo být vyšetření provedeno co nejdříve, nejpozději do 3 dnů po odběru. Laboklin využívá FACS přístroj pro různá významná vyšetření.

1. Protilátky proti trombocytům

Zvýšené množství imunoglobulinů (převážně IgG) navázaných na povrchu trombocytů vede k jejich pohlcení makrofágy (fagocytóze) a k následné trombocytopenii. Tato imunitně zprostředkovaná trombocytopenie (IMT) může být primární nebo sekundární. Vzácnější primární forma je způsobována autoprotilátkami, které jsou namířeny proti, pro trombocyty specifickému, epitopu. Oproti tomu

sekundární imunitně zprostředkovaná trombocytopenie vzniká v souvislosti s aplikací různých medikamentů, s infekčními původci (bakterie, viry, Protozoa nebo červi), nádorovými onemocněními nebo ostatními imunitně zprostředkovanými onemocněními.

Primární IMT je pozorována převážně u psů, dvakrát častěji u fen než u samců, u všech věkových kategorií, ale nejčastěji u zvířat ve středním věku.

Mezi predisponovaná plemena patří kokršpaněl, miniaturní a toy pudl, bobtail, zlatý retrívr, stejně jako německý ovčák.

Počet trombocytů je u primární IMT zpravidla nižší než 30 G/l, zřetelně nižší než u sekundární formy.

Diagnostika onemocnění může být provedena průkazem protilátek proti trombocytům pomocí FACS. K průkazu na trombocytech navázaných IgG se uskutečňuje dvojitá inkubace. Hladina protilátek < 15 % se považuje za negativní, zatímco > 30 % platí jako pozitivní průkaz IMT. Aby bylo dosaženo značení protilátkami, nesmí být vyšetřovaný materiál (EDTA-plná krev) starší než 3 dny. Vyšetření musí být provedeno před zahájením imunosupresivní terapie, v opačném případě dochází k falešně negativním výsledkům. Mezi další diagnostické možnosti patří diagnostická terapie kortikoidy, stejně jako průkaz megakaryocytární hyperplazie v kostní dřeni.

2. Status buněčné imunity

Status buněčné imunity zahrnuje velký krevní obraz, stejně jako stanovení relativního a absolutního počtu lymfocytů v periferní krvi: B-buňky, T-buňky- celkový počet, CD4+- (T-pomocné buňky) a CD8+- (cytotoxické T-

buňky). Imunofenotypizace krve spočívá v selektivním rozpoznání buněčných povrchových antigenů pomocí fluorescein-značených monoklonálních protilátek prostřednictvím průtokové cytometrie (FACS). Toto vyšetření je indikováno v případech, kdy jsou klinické příznaky podezřelé pro primární nebo sekundární poruchu buněčné imunity.

U psů má vyhotovení imunitního statutu význam jak v případě pyodermie, demodikózy, systémového Lupus erythematosus, Leishmaniózy, tak v případě vrozených defektů T-buněk. Průběžná vyšetření mohou být také využívána ke kontrole a přizpůsobení dávky léčiv.

U koní slouží k objasnění hromadných a dlouhodobých infekcí.

Zvláštní úlohu hraje určení statutu buněčné imunity v případě virové infekce kočičí imunodeficiencie (FIV).

Tento virus způsobuje chronicky perzistující infekce s progresivním průběhem onemocnění. Infikováním imunokompetentních buněk dochází pozvolna k vyčerpání imunitního systému.

Virus vykazuje zřetelný tropismus k T-lymfocytům a makrofágům. Především je přítom postižená funkce T-lymfocytů, přičemž převažují kvantitativní a také kvalitativní defekty populace T-pomocných lymfocytů. Infekce nejprve způsobuje nárůst počtu CD8+-buněk a pokles procentuálního počtu CD4+-buněk. Počet CD8+-buněk zůstává během asymptomatické fáze infekce zvýšený a klesá relativně krátce před rozvojem klinických příznaků. Na začátku infekce jsou postiženy převážně CD4+- buňky, v nichž se tím pádem vyskytuje velké množství viru. V pokročilé fázi infekce vede absolutní pokles počtu CD4+-buněk ke snížení CD4+/-/CD8+-kvocientu.

Porucha humorální imunity se projevuje relativně pozdě. Pokles počtu B-lymfocytů vzniká nejčastěji až ve finálním stádiu infekce. Množství viru v krvi opět stoupá, ale již se neuskuteční žádná protilátková odpověď.

Z tohoto důvodu se může díky vyšetření imunitního statutu zvířete odhadnout prognóza při výskytu primární nebo sekundární imunodeficiencie.

3. Diferenciace leukémie

V případě lymfocytózy $> 30 \text{ G/l}$, přesněji řečeno při klonalitou (PARR) potvrzených, lymfoproliferativních onemocněních (leukémie, lymfom ve stadiu V), při minimálním celkovém počtu leukocytů $> 5 \text{ G/l}$, může být prostřednictvím FACS provedena diferenciace leukémie. Použitím CD-markerů k identifikaci buněk se může tímto vyšetřením uskutečnit rozdělení na akutní a chronickou leukémii (CD34: marker kmenových buněk), které může poskytnout důležité informace jak k prognóze, tak k volbě léčby. Dále mohou být nádorové buňky rozděleny na B-buňky, T-lymfocyty, stejně jako na jednotlivé podtypy.

Rozlišení myeloidních leukémií prostřednictvím FACS je v Laboklinu mezitím také etablováno a může být využito obzvláště při výskytu atypických blastů nebo monocytárních buněk. Diagnóza akutní myeloidní leukémie může být také určena pomocí CD34 markerů. Stejně jako u lymfatické formy je prognóza onemocnění špatná (< 6 měsíců). Vzhledem k tomu, že je vyšetření na klonalitu omezeno pouze na lymfoproliferativní onemocnění, je diferenciace myeloidní leukémie pomocí FACS jedinou, minimálně invazivní diagnostickou metodou z periferní krve.

Kromě toho je, v případě tzv. leukemoidní zánětlivé reakce, která spočívá v extrémním posunu doleva, neutrofilii, monocytóze s celkovým počtem leukocytů $> 50 \text{ G/l}$, důležité nejprve klinické vyšetření zvířete k průkazu pyogenní infekce (např. pyothorax, pyometra, peritonitids), imunitně zprostředkovaného onemocnění (např. glomerulonefritida, IMHA), neoplazie, tkáňové nekrózy a nebo hyperestrogenismu.