

# Flow-cytometrická detekcia hematologickej malignity v atypických bunkových materiáloch

## CLK-Pracovisko Laboratórnej hematológie

RNDr. Soňa Ölvecká, Mgr. Mariana Jacková



FNsP F. D. ROOSEVELTA  
BANSKÁ BYSTRICA

- Fakultná nemocnica s poliklinikou F. D Roosevelta Banská Bystrica

# Druhy materiálov používaných v FC analýze

- **BEŽNÉ:** KRV, KD, LIKVOR, BAL, PLEURÁLNY PUNKTÁT, bunková suspenzia z UZLINY
- **ZRIEDKAVEJŠIE:** ASCIT, bunková suspenzia zo SLEZINY, KOŽE, **SEMENNÍKOV**, KOMOROVÁ VODA a TEKUTINA SKLOVCA **OKA**, .....

# FC vyšetrenie tekutiny sklovca a komorovej vody oka

- **SKLOVEC:** - vyplňa 2/3 očnej gule
  - má gélovitú konzistenciu
  - za normálnych okolností je číry
  - 98,5% sklovca tvorí voda
  
- **KOMOROVÁ VODA (vnútroočná tekutina):**
  - hustá telová tekutina
  - vyplňuje priestor medzi šošovkou a rohovkou
  - 99% tvorí voda

# TYPY VNÚTROOČNÝCH NÁDOROV

- Malígný melanóm: najčastejší typ primárneho intraokulárneho tumoru u dospelých, môže tvoriť metastázy
- Retinoblastóm: vzácny typ nádoru, ktorý sa vyskytuje hlavne u detí a adolescentov
- MALÍGNY LYMFÓM: lymfóm, ktorý sa vytvorí v očnej guli je zriedkavý nádor, niekedy ťažko diagnostikovatelný; väčšina vnútroočných lymfómov sú tzv. ne-Hodgkinove podtypy lymfómu (NHL) - najbežnejším je DLBCL = Difúzny veľkobunkový B-lymfóm

Najbežnejším typom lymfómov z očných adnex (súhrnné označenie pomocných orgánov oka) sú B-bunkové lymfómy MALT typu

- **Materiál a postup prípravy vzorky pre FC analýzu**

- Objem odobraných vzoriek je veľmi malý - (do 500  $\mu$ l ?) sú to **vzácne vzorky**;
- Lekár rozhodne, na aké vyšetrenia sa sklovec bude zasielať
- Vo všeobecnosti ťažšie hodnotiteľné FC, cytologicky, histologicky
- Menej skúseností s uvedeným typom vzoriek

# POSTUP SPRACOVANIA A PRÍPRAVY VZORKY

- Doručenie vzorky: bezprostredne po odbere, bez fixatíva, objem do 500  $\mu$ l !!
- Spracovanie vzorky: hneď
- 50  $\mu$ l (30  $\mu$ l) vzorky/skúmavku + MoAb; 15 min inkubácia pri RT; prímes erytrocytov lyzovaná s  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,5-1,0 ml); premyť s FZ alebo PBS
- Analýza na premytom FC NAVIOS-Beckman-Coulter

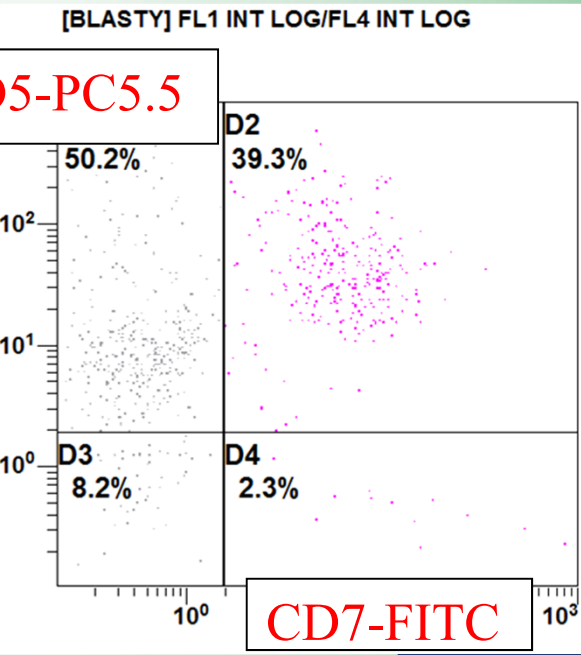
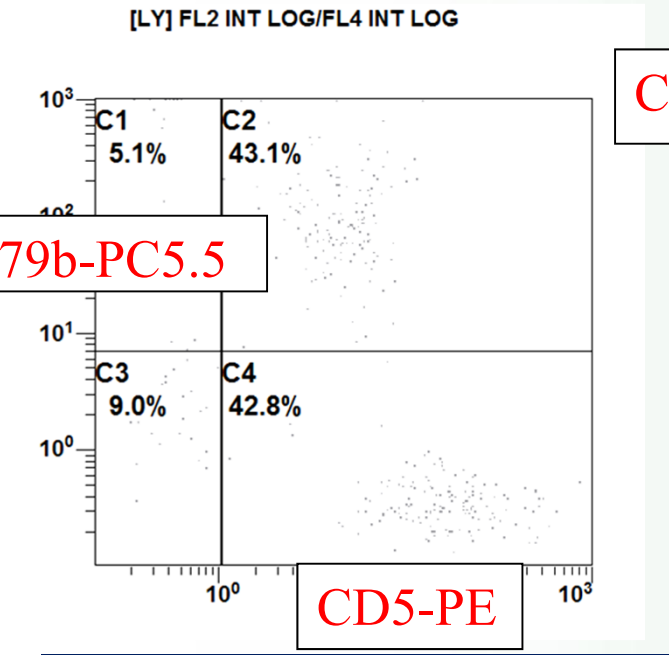
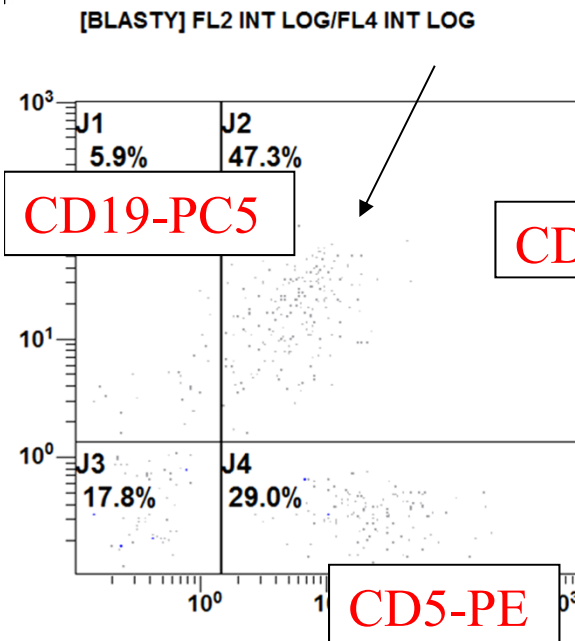
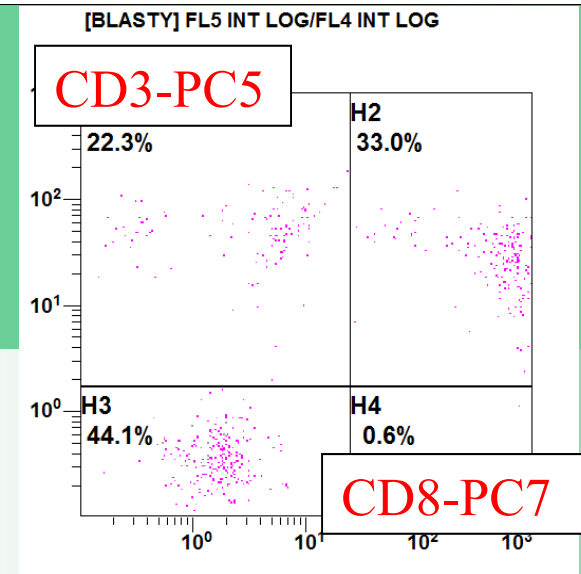
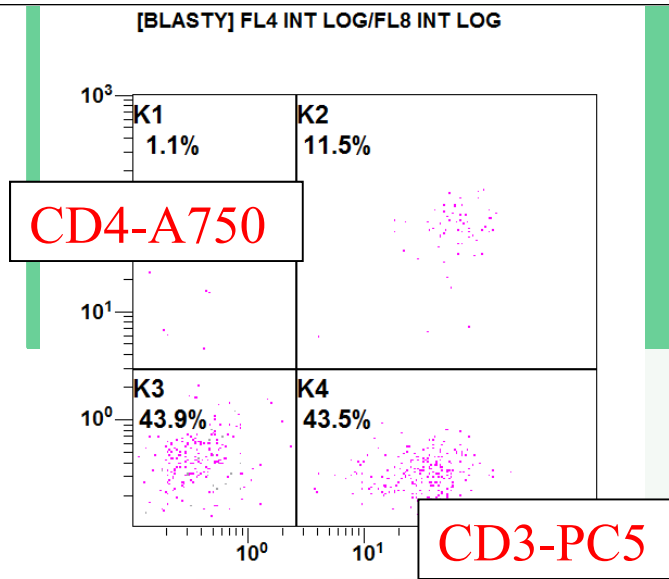
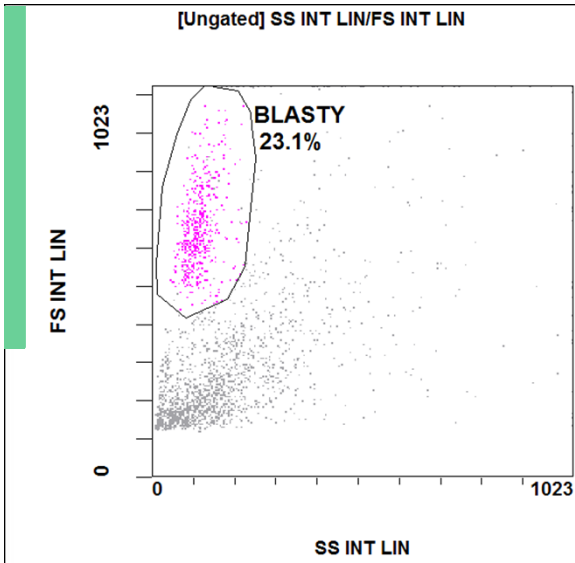
Poznámka

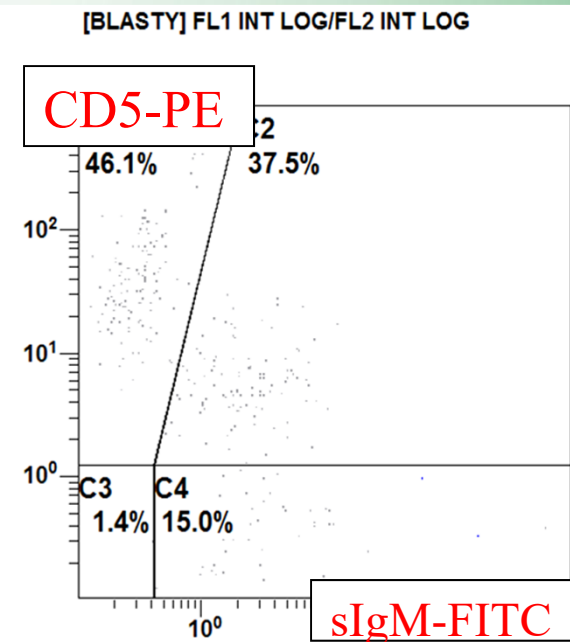
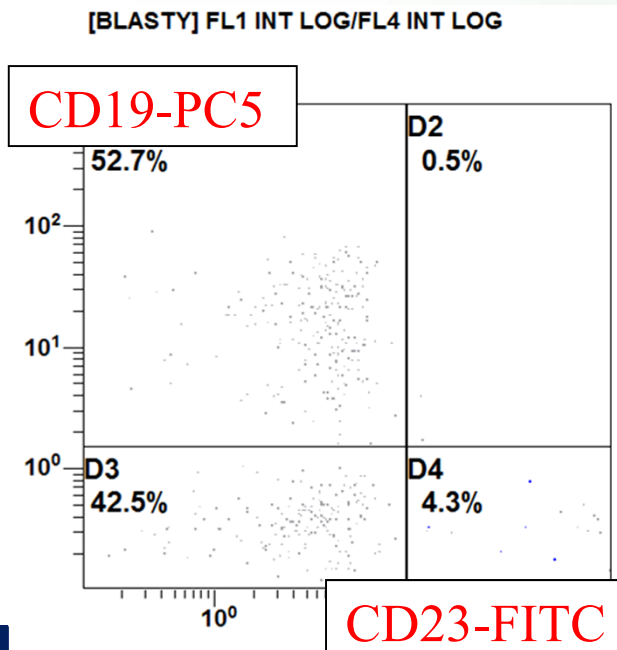
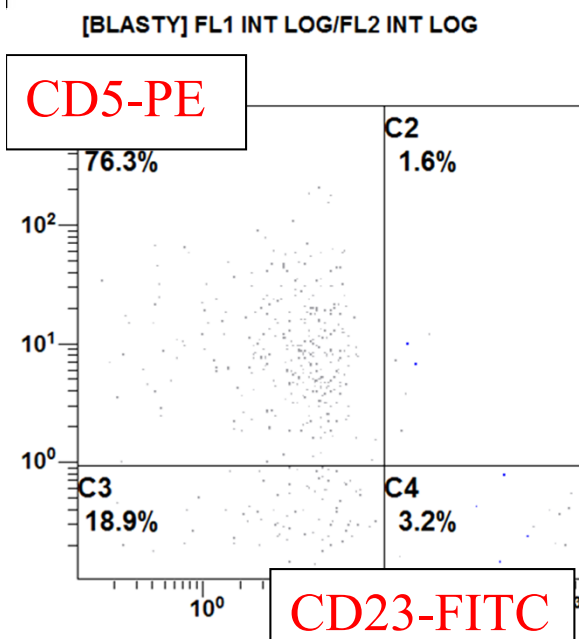
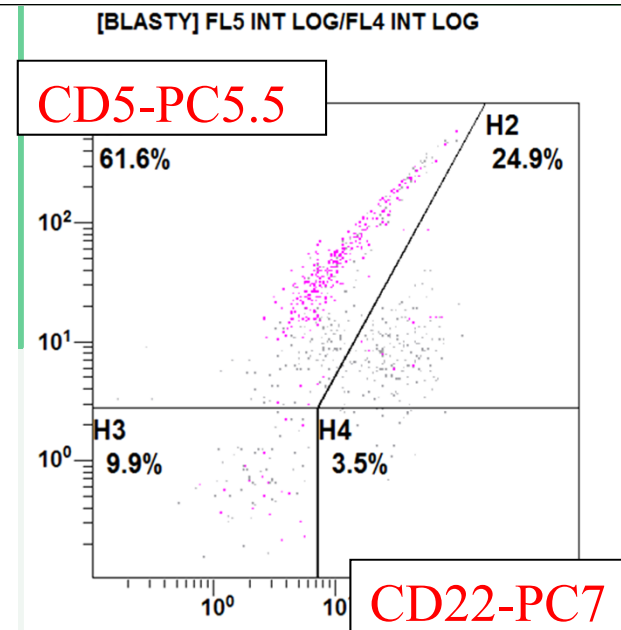
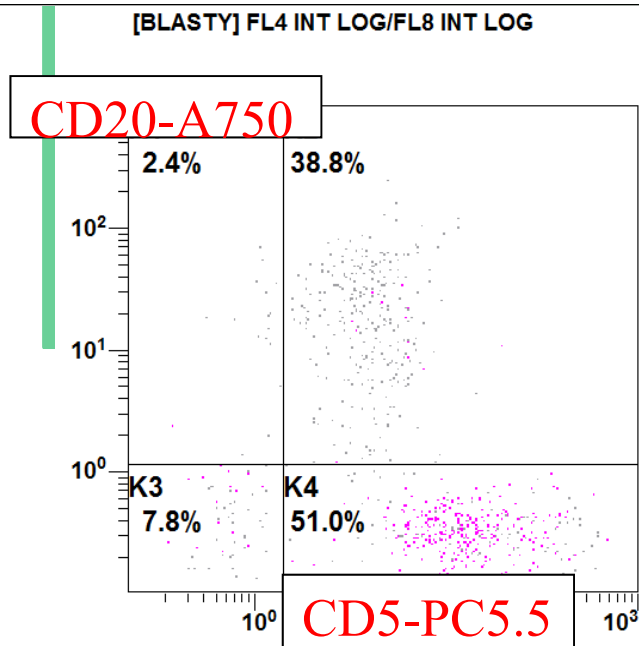
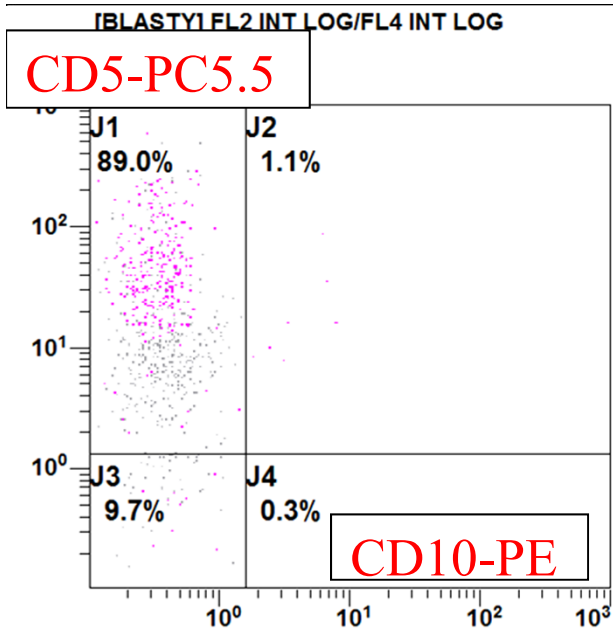


PACIENT	DÁTUM FC ANALÝZY	VÝSLEDOK FC ANALÝZY	VÝSLEDKY z CYTOLÓGIE+...
1. MUŽ, 1956	17.08.2007	dg.MCL,sIgM+	Trepanobiopsia KD+ histológia tonzily: B-NHL najskôr B-CLL/B-SLL
FC krvi: MCL ale IgD+; rezistencia ochorenia na chemoterapiu			
2. ŽENA, 1936	23.01.2014	susp.T-LPO; CD1a+, CD4>>,CD8<<	nevykonaná
V prípade primárneho LPO oka by za 2-ročnú anamnézu problému ochorenie s temer istotou progredovalo do CNS - bez podozrenia a progresie; FC krvi: bez dôkazu patológie, len CD3+CD4+/CD3+CD8+ = 2,25			
3. ŽENA, 1942	07.04.2015	Bez známok nádorového ochorenia	Bez známok nádorového ochorenia

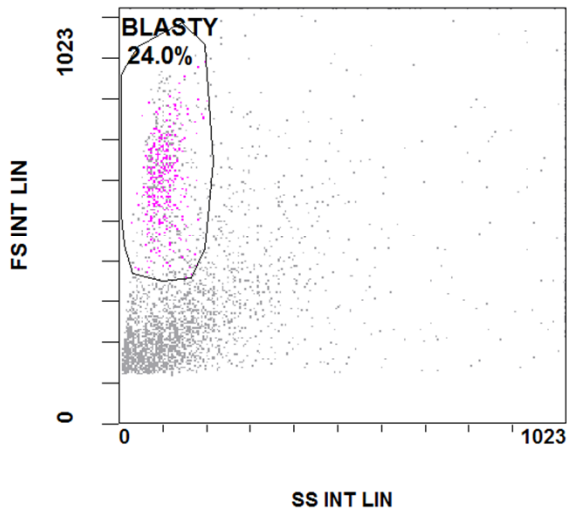
PACIENT	DÁTUM FC ANALÝZY	VÝSLEDOK FC ANALÝZY	VÝSLEDKY z CYTOLÓGIE
4. ŽENA, 1939	05.08.2015	Pravé oko: CD5- B-NHL (DLBCL, SLMZ?)	Uveálny/reti- -nálny DLBCL
Nález z ľavého oka negatívny			
5. MUŽ, 1953	17.01.2017	Bez jednoznač- nej detekcie patológie	Hematológ nevie zhod- notiť (aj blasty, aké?)
Výsledok z MBC: Atypické B-bunky nejasného pôvodu, môže ísť aj o post- infekčné zmeny			
6. ŽENA, 1956	03.10.2017	Pravé oko: MCL aj CD5+DLBCL	Možno MCL, nie DLBCL
Výsledok z MBC: sklovec nedodaný; KD: atypická B-LPO nejasnej špecifiká- cie, pacientka po transplantácii ľavých pľúc;			



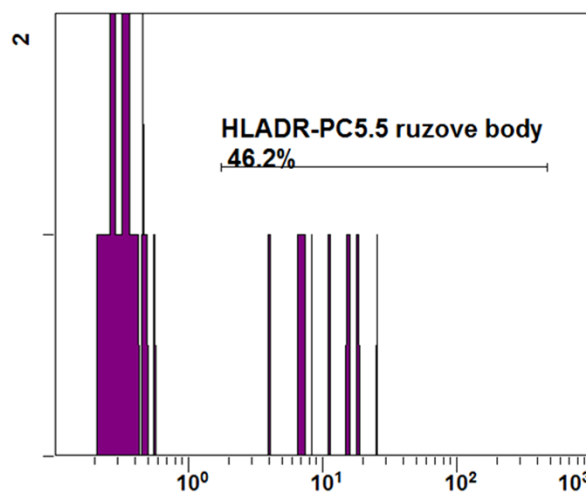




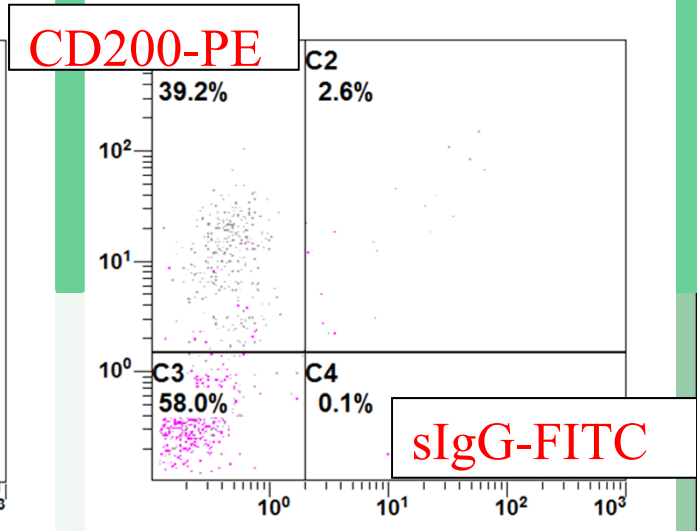
[Ungated] SS INT LIN/FS INT LIN



[BLASTY] FL4 INT LOG



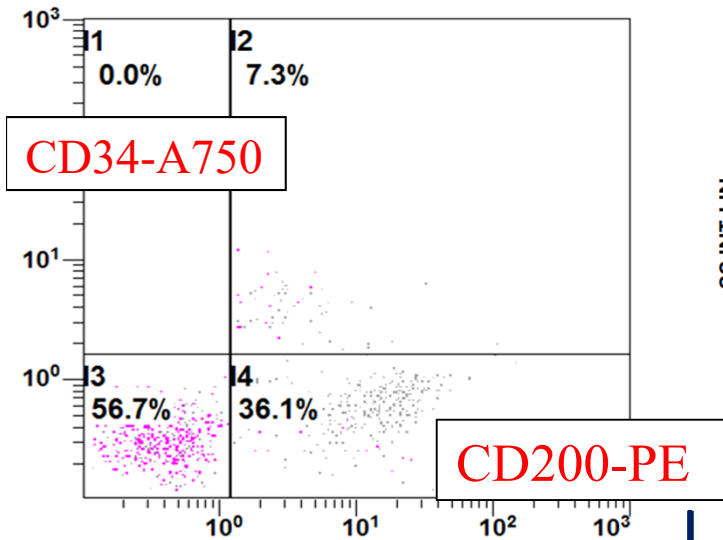
[BLASTY] FL1 INT LOG/FL2 INT LOG



CD200-PE

sIgG-FITC

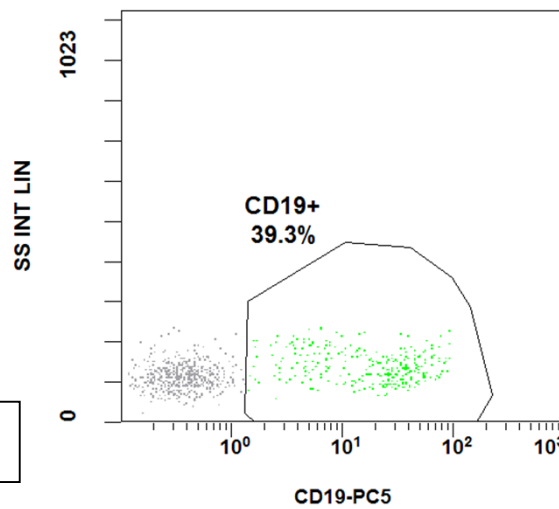
[BLASTY] FL2 INT LOG/FL8 INT LOG



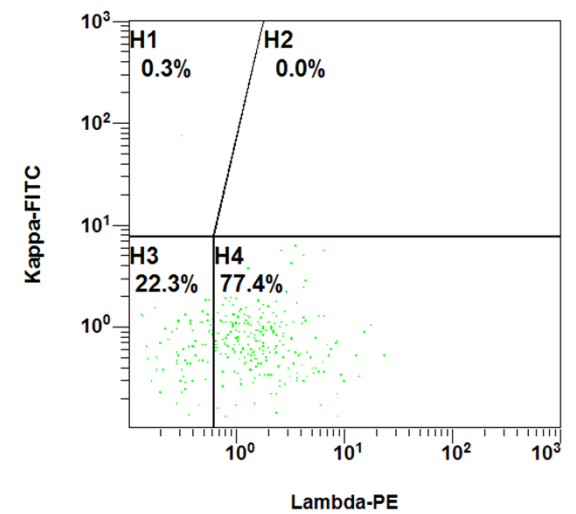
CD34-A750

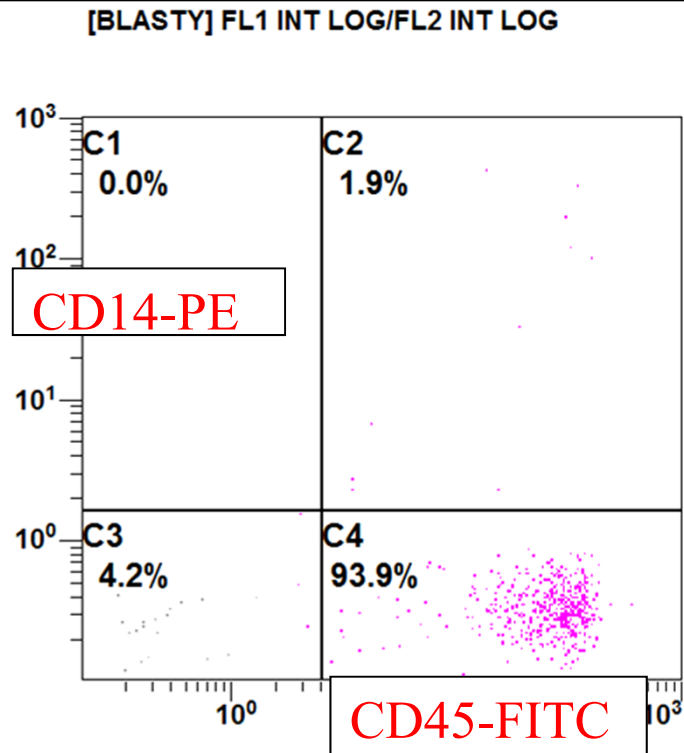
CD200-PE

[LYMFO] FL4 INT LOG/SS INT LIN



(5000) [LYMFO AND CD19+] FL2 INT LOG/FL1 INT LOG





- Rozdielne výšky expresií pre určité MoAb v rôznych testoch
- Počet analyzovaných buniek od 280 do 770

Poznámka

+ znaky	- znaky
CD19	CD34 (5-7%)
CD20	CD10
CD5	sIgG
CD45	CD23 ?
sIgM	
Lambda (Slabá I)	
HLA-DR	
CD22 slabšia	

PACIENT	DÁTUM FC ANALÝZY	VÝSLEDOK FC ANALÝZY	VÝSLEDOK CYTOLÓGIE
7.ŽENA, 1945	14.02.2018	Bez jednoznačnej detekcie patologických buniek	Bez jednoznačnej infiltrácie patol. elementami

**Výsledok z MBC:** Sklovec nevyšetrený; materiál z tumoru hornej čeluste: blastický B-NHL typu DLBCL

# Detekcia a stanovenie typu patologických buniek v zmysle hematologickej malignity v sklovci je založené na cytológii a FC

- FC je užitočná metóda pre stanovenie, potvrdenie, resp. podporenie diagnózy získanej cytologickým vyšetrením - nevyhnutným je rýchle spracovanie vzorky pre zabránenie cytolýzy buniek (cytolýzu spôsobujú aj kortikosteroidy)

## FC detekcia leukemických blastov po infiltrácii semenníkov

- Takmer 25% mužov s ALL má subklinickú infiltráciu pohlavných žliaz s leukemickými blastami
- Len u 2% z nich je prítomná jasná choroba, väčšina z nich sú deti, alebo adolescenti s T-ALL (>>leuko a obyčajne mediastínová masa)
- Pri súčasnej terapii je infiltrácia semenníkov vzácná aj v relapse ochorenia (cca 10% zo všetkých relapsov)

## FC detekcia leukemických blastov po infiltrácii semenníkov

- Najskôr musí byť vylúčený ako pôvodca opuchu semenníkov zápal
- Niekedy je potrebná orchiektómia; biopsia je skôr výnimkou
- Testikulárny nádor v čase stanovenia diagnózy nemá vplyv na klasifikáciu iniciačného rizika
- Ak je biopsia nevyhnutná a detegujú sa leukemické blasty, pacient musí byť ďalej menežovaný s HR stratégiou. Pretrvávajúca leukémia testes môže vyžadovať lokálnu rádioterapiu, **alebo ...**



**Pacient:** chlapec, 2004

FC stanovenie dg. z KD dňa 25.03.2015:

**COMMON-B-ALL**, bez koexpresí znakov iných línií

<b>+ znaky</b>	<b>- znaky</b>
<b>CD10</b>	<b>cyIgM</b>
<b>CD19</b>	<b>sIgM</b>
<b>cyCD79a</b>	<b>Kappa, Lamda</b>
<b>CD24</b>	<b>CD79b</b>
<b>TdT</b>	<b>CD13</b>
<b>CD45</b>	<b>CD33</b>
<b>CD34</b>	<b>CD117</b>
<b>HLA-DR</b>	<b>CD14</b>
<b>CD38</b>	<b>CD3, CD4, CD8, CD2</b>
<b>CD22</b>	<b>CD65</b>
<b>CD20 slabšia</b>	<b>CD15</b>

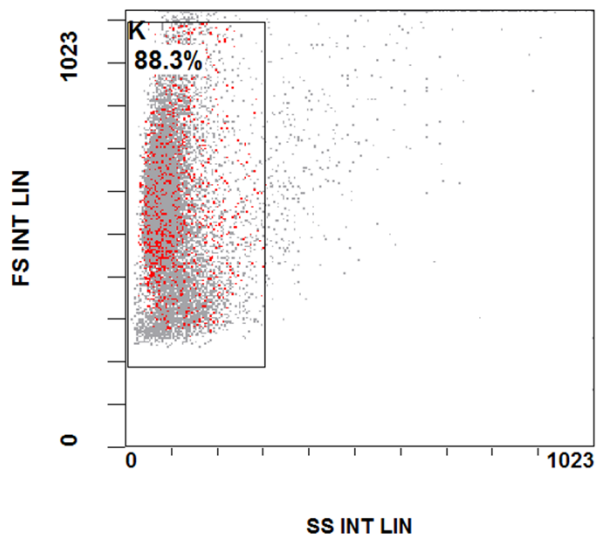
Poznámka

**Relaps ochorenia: 06.12.2017**

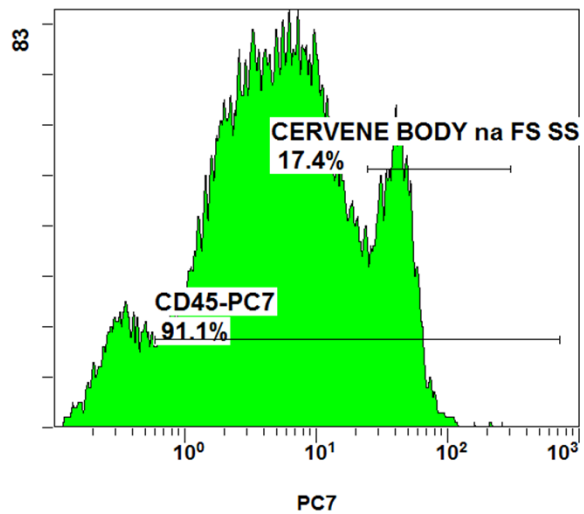
**FC analýza KD: rovnaký imunofenotyp patolog. lymfoblastov ako v čase stanovenia dg.**

- 07.12.2017: IF buniek pravého aj ľavého semenníka – FC analýza potvrdila infiltráciu patologickými blastami pôvodného fenotypu v oboch semenníkoch
- Postup pri príprave vzoriek:
  - bunky z malého kúsku tkaniva sme vyplavovali jeho napichovaním s ihlou a FZ; suspenziu premyť
  - minimálne množstvo ery bolo lyzované s  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; premyť
  - inkubácia s MoAb 15 min pri RT
  - premyť s FZ
  - hneď analyzovať na cytometri
- **ALTERNATÍVY V POSTUPE** 😊

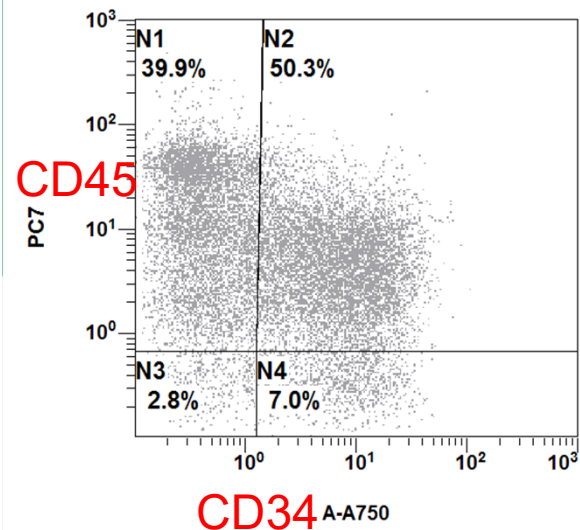
[Ungated] SS INT LIN/FS INT LIN



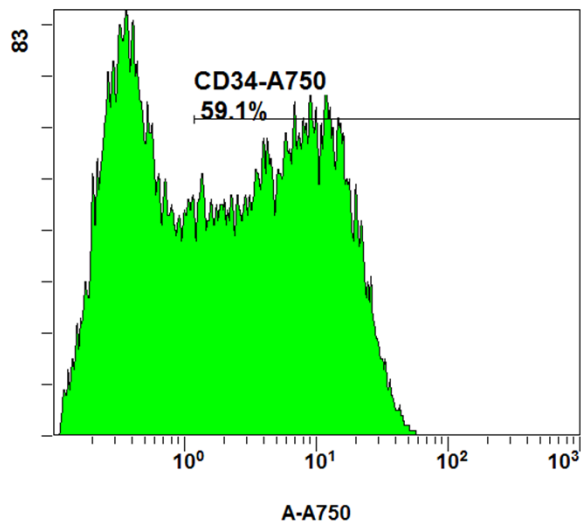
[K] FL5 INT LOG



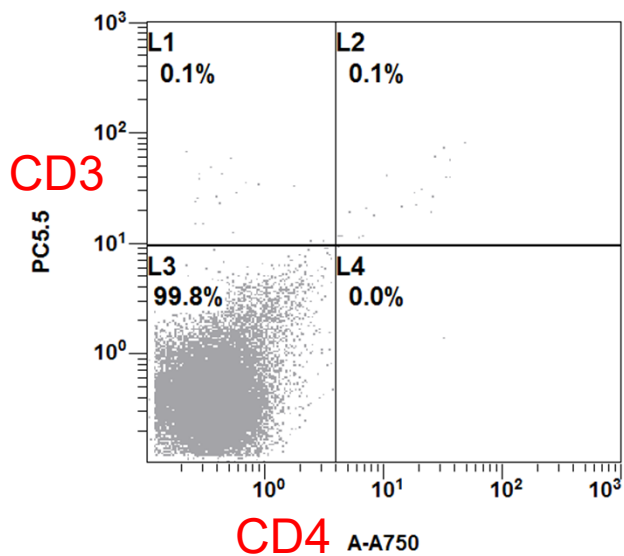
[K] FL8 INT LOG/FL5 INT LOG



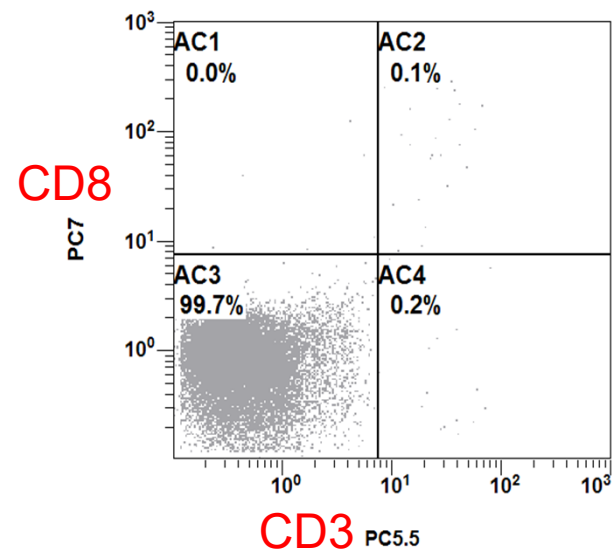
[K] FL8 INT LOG



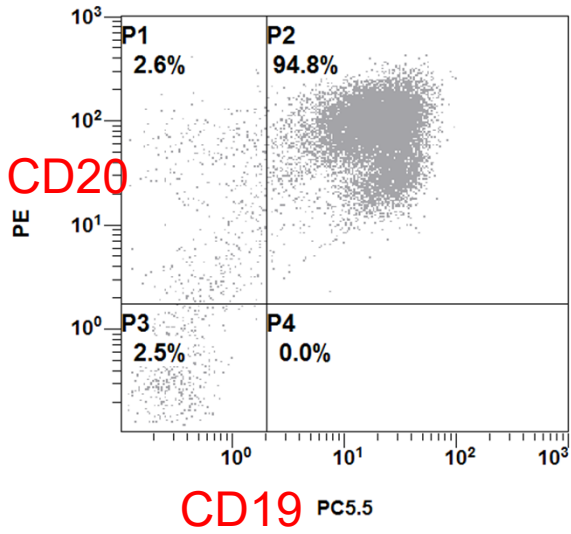
[K] FL8 INT LOG/FL4 INT LOG



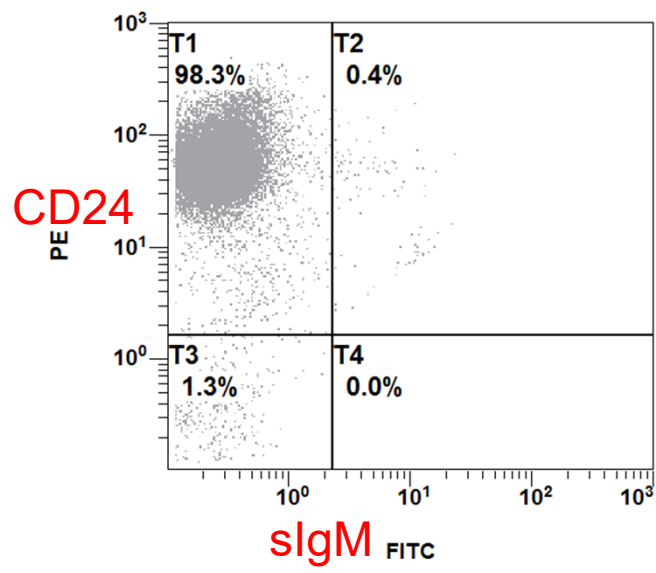
[K] FL4 INT LOG/FL5 INT LOG



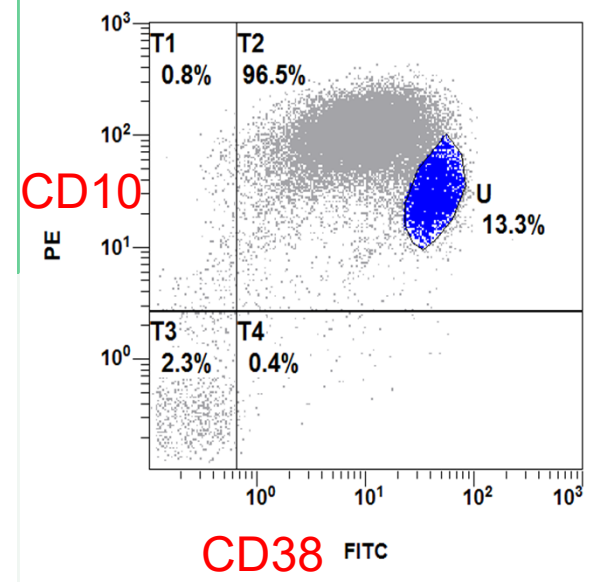
[K] FL4 INT LOG/FL2 INT LOG



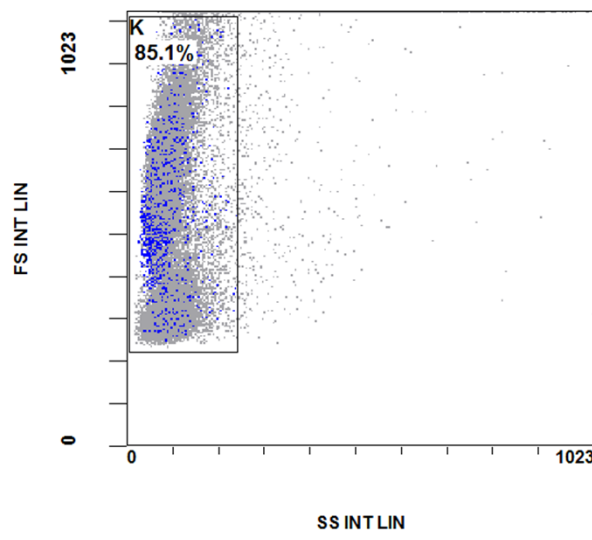
[K] FL1 INT LOG/FL2 INT LOG



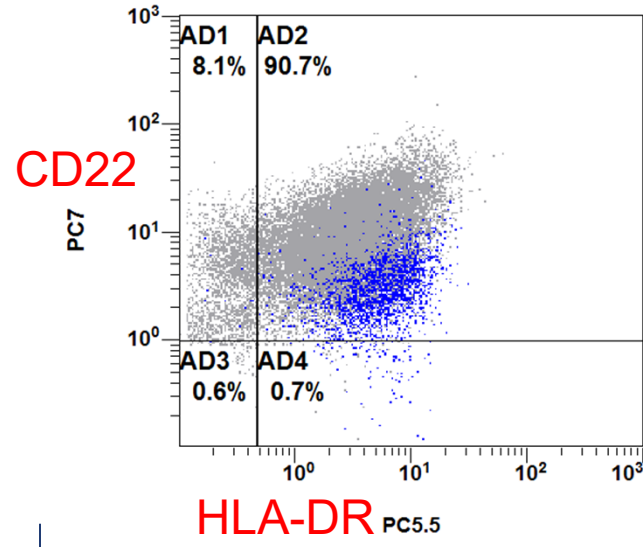
[K] FL1 INT LOG/FL2 INT LOG



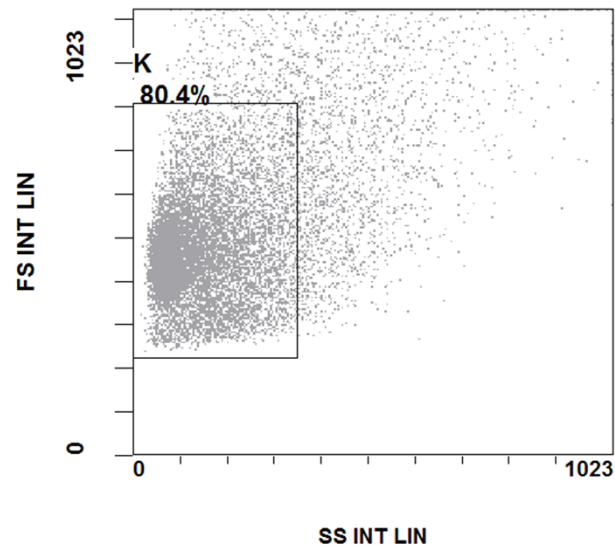
[Ungated] SS INT LIN/FS INT LIN



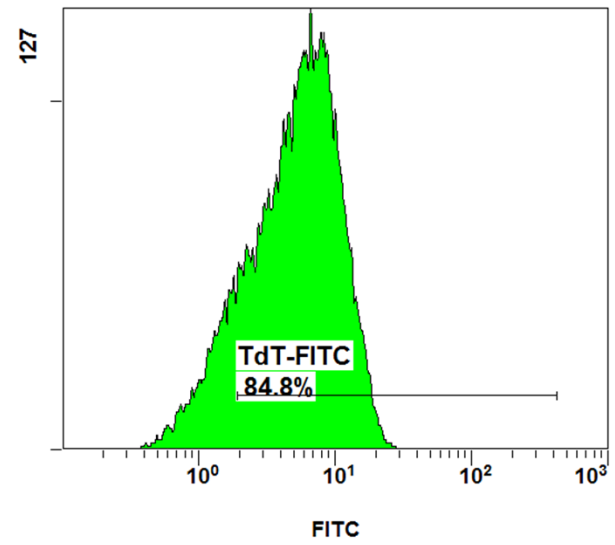
[K] FL4 INT LOG/FL5 INT LOG



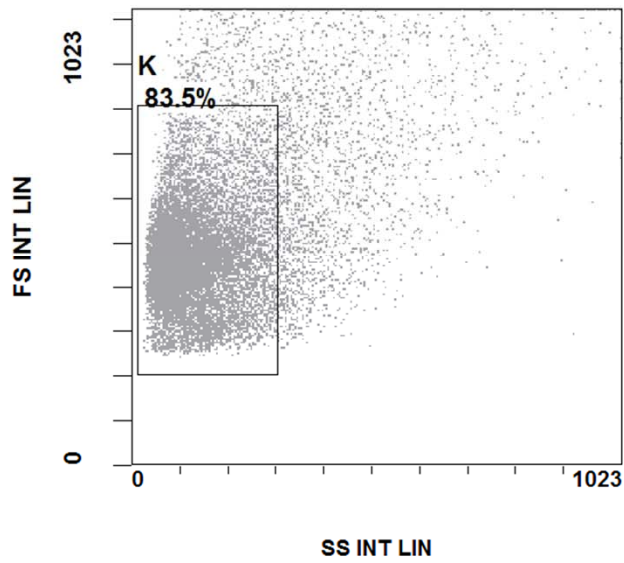
[Ungated] SS INT LIN/FS INT LIN



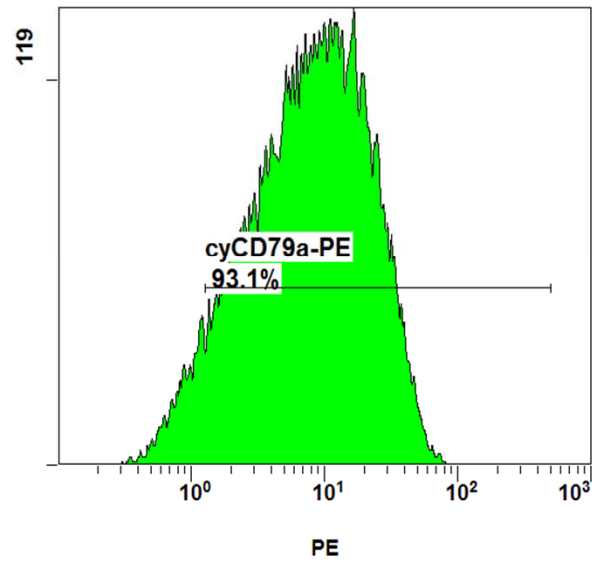
[K] FL1 INT LOG



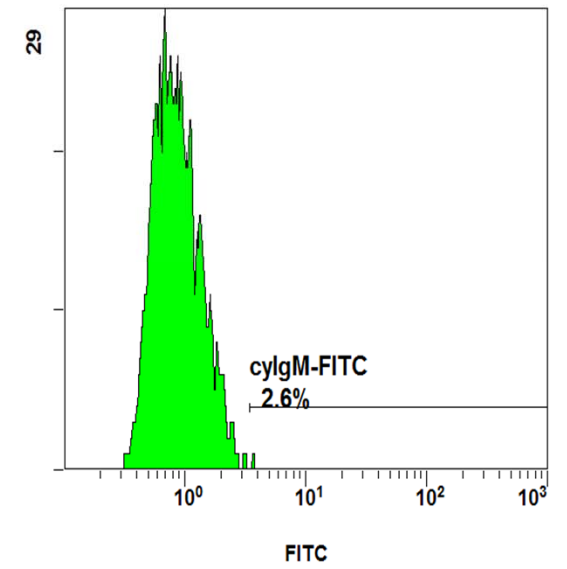
[Ungated] SS INT LIN/FS INT LIN



[K] FL2 INT LOG



[K] FL1 INT LOG



## Porovnanie znakov pozitívnych v čase stanovenia dg. z KD a pri relapse ochorenia z oboch testes

<b>+ znaky z KD</b>	<b>+ znaky z testes</b>
<b>CD10</b>	✓
<b>CD19</b>	✓
<b>cyCD79a</b>	✓
<b>CD24</b>	✓
<b>TdT</b>	✓
<b>CD45</b>	✓
<b>CD34</b>	✓
<b>HLA-DR</b>	✓
<b>CD38</b>	✓
<b>CD22</b>	✓
<b>CD20 slabšia</b>	✓ výrazné zastúpenie

Ďakujem za pozornosť

