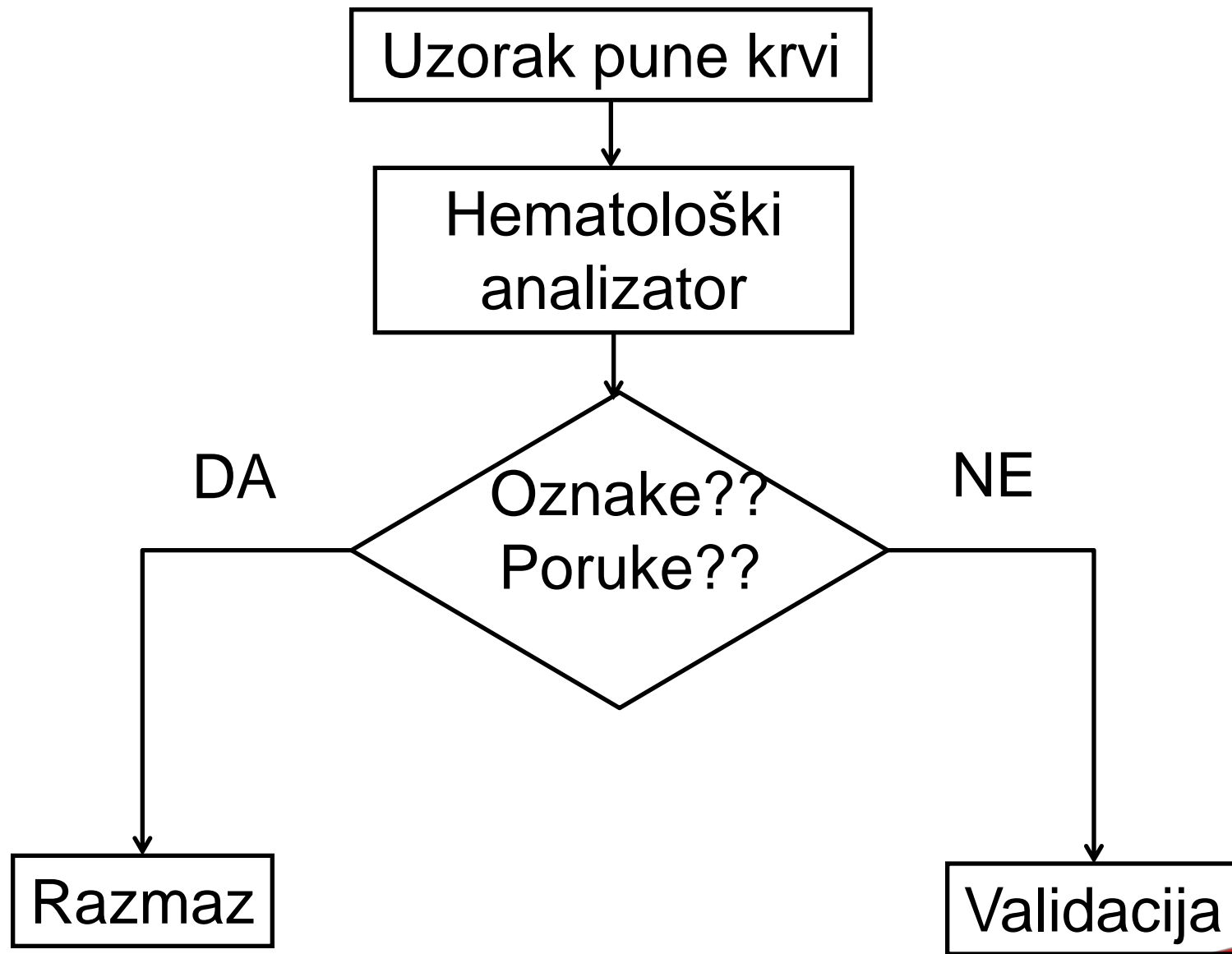


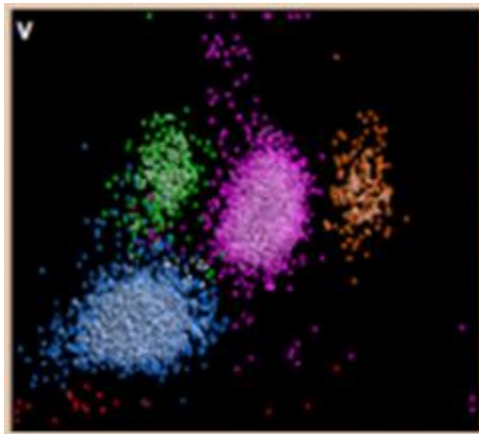
# Hemato – Flow

## Novi pristup u analizi DKS-a

Anica Remenar  
Beckman Coulter







WBC Est		
Neut	52	60
Lymph	35	29
Mono	7	8
Eos	1	3
Baso	1	
NRBC		
Band		
Imm Gran		
Var Lymph		
Blast		

*Myelo. 4*

Abnormalni  
uzorci

Brojanje 100  
stanica pod  
mikroskopom

Pojavom  
sumnjivih  
stanica razmaz  
se šalje  
citologu

100 CELLS COUNT AT  
MICROSCOPE:

1<sup>ST</sup> RUN 3 EO, 0 MYELOCYTES

2<sup>ND</sup> RUN 1 EO, 4 MYELOCYTES

WBC	3.21	L	10 <sup>3</sup> /μL
NE %	19.88	L	%
LY %	57.77	H	%
MO %	12.87	H	%
EO %	8.53	H	%
BA %	0.95		%
NRBC %	0.00		%



# Ograničenja ručne analize diferencijalne kvne slike

- Pogrešan izbor područja brojenja na razmazu
- Rezultat ovisi isključivo o osobi koja mikroskopira
- Slaba učinkovitost (zahtijeva puno vremena)
- Statističke pogreške u brojanju

# Rümke Table

a	n=100	n=200	n=500	n=1.000	n=10.000
0	0 – 3.6	0 – 1.8	0 – 0.7	0 – 0.4	0 – 0.1
1	0.0 – 5.4	0.1 – 3.6	0.3 – 2.3	0.5 – 1.8	0.8 – 1.3
5	1.6 – 11.3	2.4 – 9.0	3.3 – 7.3	3.7 – 6.5	4.5 – 5.5
10	4.9 – 17.6	6.2 – 15.0	7.5 – 13.0	8.2 – 12.0	9.4 – 10.7
15	8.6 – 23.5	10.4 – 20.7	12.0 – 18.4	12.8 – 17.4	14.3 – 15.8
20	12.7 – 29.2	14.7 – 26.2	16.6 – 23.8	17.6 – 22.6	19.2 – 20.8
30	21.2 – 40.0	23.7 – 36.9	26.0 – 34.2	27.2 – 32.9	29.1 – 31.0
40	30.3 – 50.3	33.2 – 47.1	35.7 – 44.4	36.9 – 43.1	39.0 – 41.0
50	39.8 – 60.2	42.9 – 57.1	45.5 – 54.5	46.9 – 53.1	49.0 – 51.0
70	60.0 – 78.8	63.1 – 76.3	65.8 – 74.0	67.1 – 72.8	69.0 – 70.9
80	70.8 – 87.3	73.8 – 85.3	76.2 – 83.4	77.4 – 82.4	79.2 – 80.8
90	82.4 – 95.1	85.0 – 93.8	87.0 – 92.5	88.0 – 91.8	89.3 – 90.6
100	96.4 – 100	98.2 – 100	99.3 – 100	99.6 – 100	99.9 – 100

*Fig. 1: Rümke Table – shows the statistical inaccuracy which results when counting out a defined number (n). Thus, the number of e.g. band cells can vary in a slide between 4.9 and 17.6 when 100 cells are counted out and 10 band cells are actually present. (Variation of the number due to subjective assessment is not taken into account here.)*

# Automatizacija : Hemato-Flow



Analyser LH 750  
(or DxH800)



or



FC 500

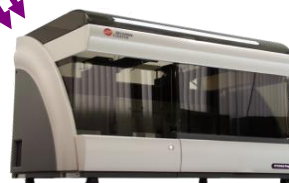


REMISOL

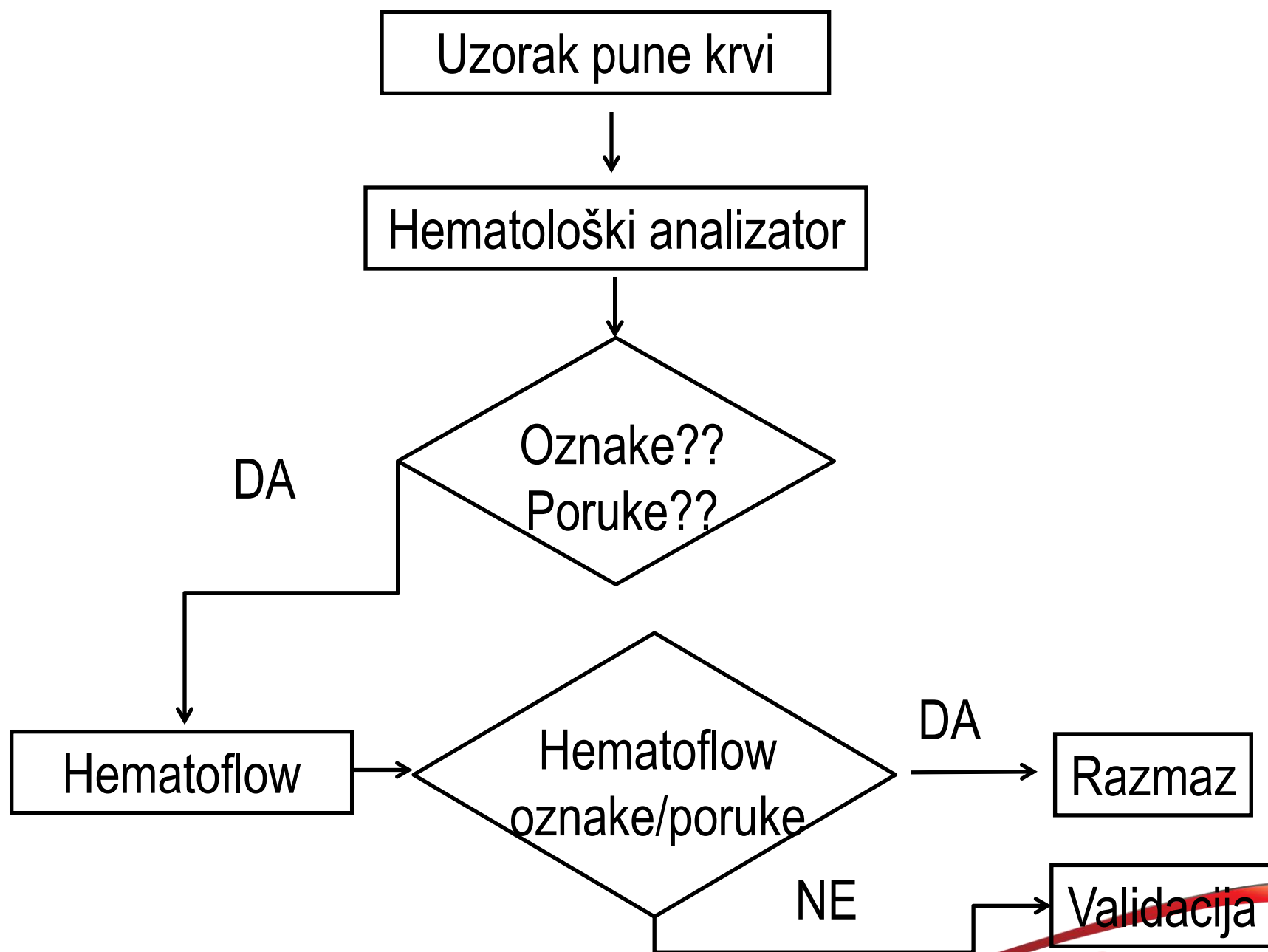


Cytodiff

Autre



Sample Prep  
FP 1000



# Hemato-Flow Cyto Diff panel

1 bočica

6 monoklonskih antitijela

5 boja

16 populacija

- **CD16PC5** : zreli i nezreli granulociti, citotoksični limfociti, limfociti T/NK
- **CD2+CD294+PE** : eozinofili, bazofili, aktivirani T, T i NK stanice
- **CD45PC7** : leukociti
- **CD36FITC** : monociti
- **CD19ECD** : limfociti B i B prekursori.

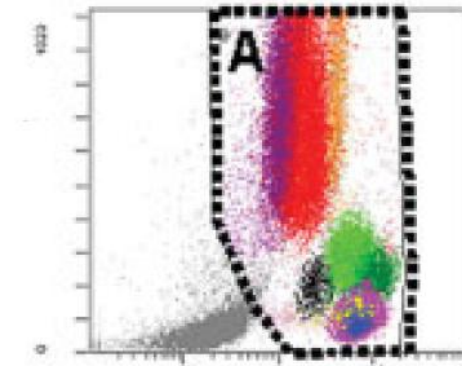




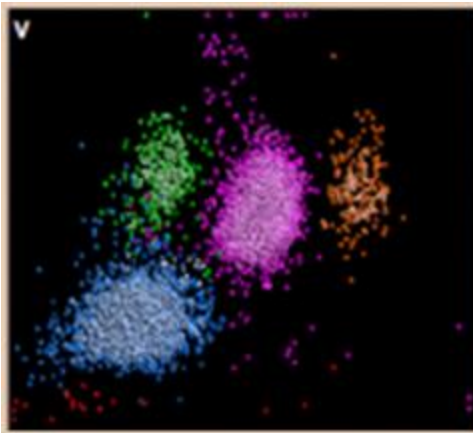
Abnormalni  
uzorci

Analiza 20,000  
stanica

Analiza stanica  
protočnim  
citometrom



A: LEUKOCYTES IN COLORS WBC  
DIFFERENTIAL IN 30.000 CELLS



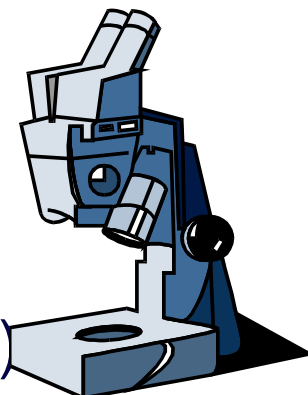
WBC	3.21	L	10 <sup>3</sup> /μL
NE %	19.88	L	%
LY %	57.77	H	%
MO %	12.87	H	%
EO %	8.53	H	%
BA %	0.95		%
NRBC %	0.00		%

CELL TYPE	FCM TYPE
Lymphocytes	
■	B-lymphocytes
■	Non cytotoxic T-lymphocytes
■	Cytotoxic T/NK lymphocytes
Granulocytes	
■	Neutrophils
■	Eosinophils
■	Basophils
Monocytes	
■	CD16neg monocytes
■	CD16pos monocytes
Immature cells	
■	Immature granulocytes
■	Myeloid precursors
■	B-cell precursors
■	T-cell precursors
■ + ■ + ■	Total circulating precursors

(1) CytoDiff

# Protočna citometrija

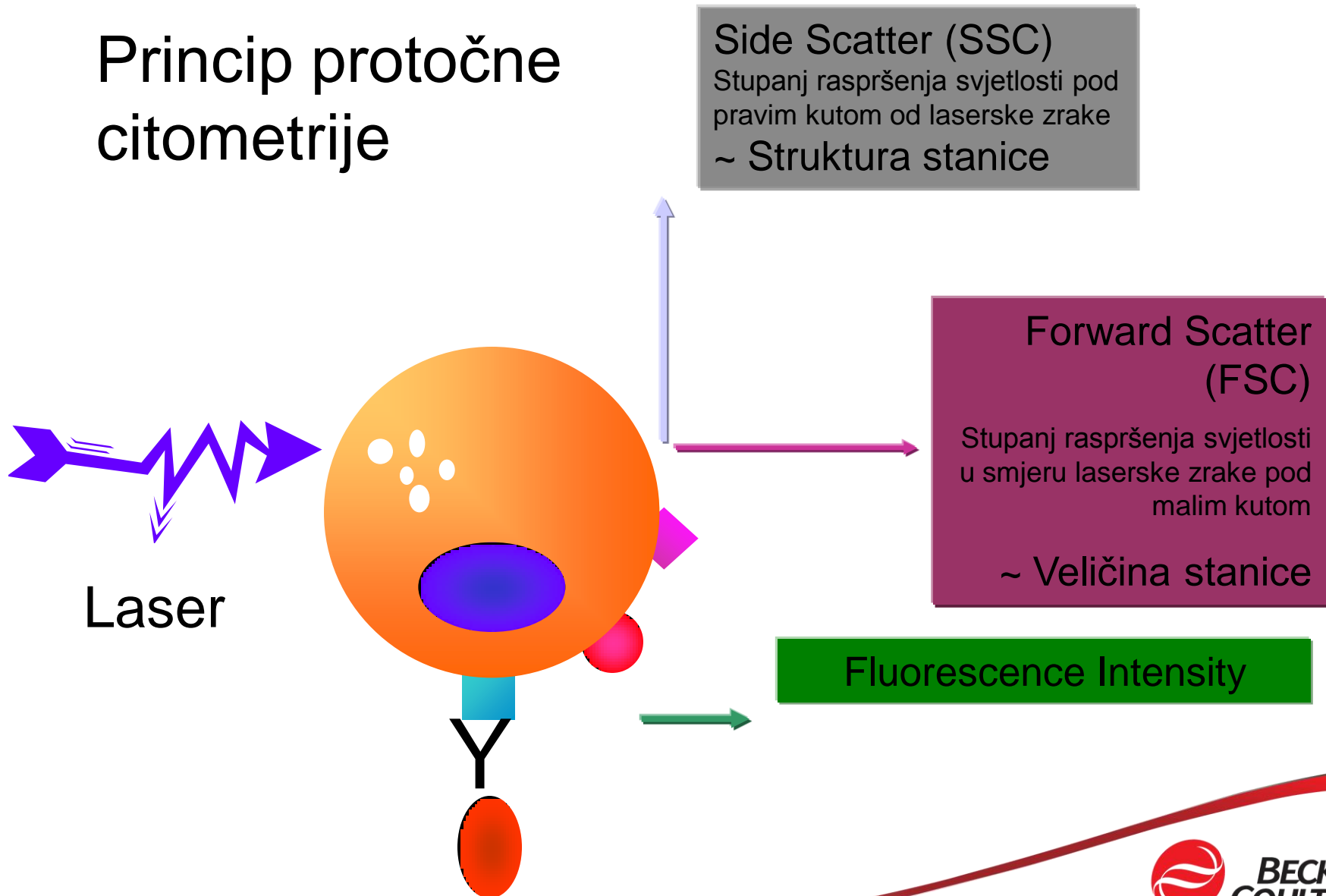
- Automatizirana fluorescentna mikroskopija
- grupa analitičkih metoda koje omogućavaju multiparametarsku analizu morfoloških, biokemijskih i funkcionalnih karakteristika stanica, staničnih organela i unutarstaničnih molekula
- Ciljevi automatizacije:
  - analiza pojedinačnih stanica
  - analiza uzorka relevantne veličine (nekoliko desetaka tisuća čestica uzorka)
  - analiza u razumnom vremenu ( $>10^3$  stanica/s)
  - objektivna metoda koja isključuje subjektivnu procjenu fluorescencije pod mikroskopom



# Stanični fenotip

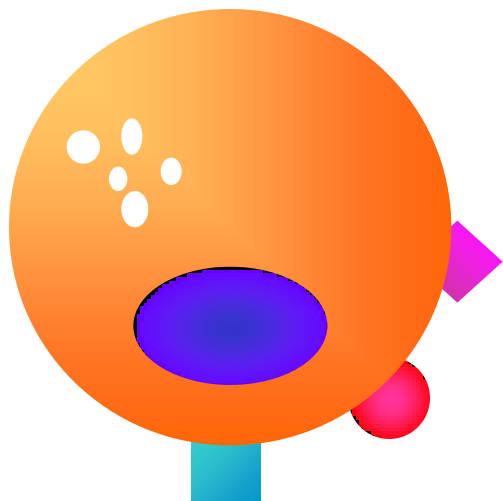
- na membrani svake stanice eksprimirane su molekule (proteini i glikoproteini) različitih bioloških funkcija koje nazivamo **STANIČNIM DIFERENCIJACIJSKIM ANTIGENIMA**
- vrsta i broj određenih diferencijacijskih antigena na stanicama naziva se fenotipom

# Princip protočne citometrije

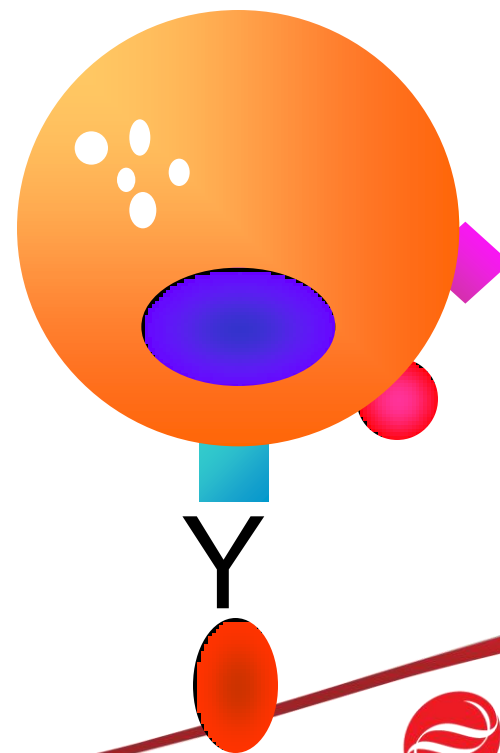


# Određivanje staničnog fenotipa

površinski  
stanični antigeni



fluorokromima obilježena  
monoklonska antitijela



# Primjena protočne citometrije u biomedicini

- **Imunofenotipizacija stanica** (određivanje staničnih diferencijacijskih antigena pomoću fluorokromima obilježenih monoklonskih antitijela)
- Određivanje unutarstanične **DNA/RNA** (važna komponenta dijagnostike malignih bolesti)
- Analiza **funkcionalnih obilježja stanice** (detekcija unutarstaničnih citokina, enzima, iona)
- Analiza **bakterija, gljiva, algi**

# Imunofenotipizacija

- vrsta stanice
- stupanj sazrijevanja stanice
- vijabilnost stanice i podatak o tipu stanične smrti
- da li je stanica maligno transformirana ili nije
- da li je aktivirana, da li proliferira

# Cyto Diff – 16 parametara diff

- **9 CE parametara:**
  1. **B Limfociti**
  2. **T/NK Limfociti**
  3. **Ukupni Limfociti**
  4. **Ukupni Monociti**
  5. **Neutrofilni granulociti**
  6. **Eozinofili**
  7. **Bazofili**
  8. **Nezreli Granulociti**
  9. **Blasti ukupno**



# Cyto Diff – 16 parametara diff

- **7 RUO parametara**
  - 1. Nezreli T limfociti**
  - 2. Nezreli B limfociti**
  - 3. Nezreli non-T i non-B leukociti**
  - 4. Granulirani T i NK stanice**
  - 5. Ne citotoksični-T i NK stanice**
  - 6. Upalni monociti**
  - 7. Ne upalni monociti**

# Postupak

- PrepPlus2 - Brza priprema uzorka: krv + CytoDiff – cca 10 - 15 min za pripremu 12 uzoraka (ili ručno pipetiranje)
- 10 min inkubacija (liza se pokreće automatski na TQ Prep Workstation nakon ovih 10 min inkubacije)
- TQ Prep Workstation - liza eritrocita: non wash metoda - VersaLyse – cca 10 min za 12 uzoraka
- Analiza: **20 000 WBC** – cca 1 min po uzorku – ovisno o broju WBC u uzorku

# HematoFlow više nije koncept nego realnost

- Diferencijalna krvna slika (DKS) pomoću hematološkog brojača i mikroskopski pregled razmaza ograničavaju nas na samo 5 leukocitinih subpopulacija
- Identifikacija abnormalnih stanica je samo kvalitativna, često problematična sa slabo ponovljivim rezultatima (analiza samo 100 stanica)

# HematoFlow

- Nova metoda određivanja diferencijalne krvne slike metodom protočne citometrije sa 6 markera, koristeći kombinaciju od 5 fluorescentnih boja; CD36-FITC/CD2-PE1CRTH2-PE/CD19-ECD/CD16-Cy5/CD45-Cy7
- protočna citometrija omogućava istodobno mjerenje nekoliko strukturalnih i funkcionalnih parametara svake pojedinačne stanice u uzorku

100 Uzoraka pune krvi



Hematološki analizator



DA

Oznake??  
Poruke??



20 Hematoflow

Hematoflow  
oznake/poruke

DA

3 Razmaz

NE

17 Validacija

# Prednosti automatizirane analize DKS-a

- Prednost analize diferencijalne krvne slike protočnom citometrijom je u brzjoj analizi velikog broja leukocita (obično 10 000 leukocita)
- Analiza protočnom citometrijom bolja je u detekciji i kvantifikaciji blastičnih stanica i/ili nezrelih granulocita
- Također, prednost analize DKS-a protočnom citometrijom je u detekciji CD16 pozitivnih upalnih monocita

## Refining the White Blood Cell Differential: The First Flow Cytometry Routine Application

Mikael Roussel,<sup>1\*</sup> Cyrille Benard,<sup>1</sup> Beatrice Ly-Sunnaram,<sup>1</sup> Thierry Fest<sup>1,2\*</sup>

- 800 hematoloških uzoraka (1 dan) - normalno 25 % treba ručno diferenciranje (160 – 200 slideova dnevno)
- Nakon CytoDiff – samo 22 uzorka trebala ručni diff (+ 16 koji su imali RBC flags)

## “6 Markers/5 Colors” Extended White Blood Cell Differential by Flow Cytometry

Jean-Luc Faucher,<sup>1</sup> Charlotte Lacronique-Gazaille,<sup>1</sup> Elise Frébet,<sup>1</sup> Franck Trimoreau,<sup>1</sup> Magali Donnard,<sup>1</sup> Dominique Bordessoule,<sup>2</sup> Francis Lacombe,<sup>3</sup> Jean Feuillard<sup>1\*</sup>

### Iz zaključka:

- WBC differential by FCM is at least as reliable as by standard cytology
- FCM was better than standard cytology in detection and quantification of circulating blast cells or immature granulocytes, with a first lineage orientation in the former case



# Zaključak

- Istraživanja<sup>1,2</sup> pokazuju da je kvantitativna detekcija abnormalnosti diferencijalne krvne slike neutrofila, eozinofila, bazofila, monocita i limfocita metodom protočne citometrije jednako pouzdana kao i standardna mikroskopija krvnih razmaza
- Cyto Diff je bolji od citologije u detekciji nezrelih granulocita i blasta

- 1. Jean-Luc Faucher et al., „6 Markers/5 Colors” Extended White Blood Cell Differential by Flow Cytometry, Cytometry Part A, 71A: 934\_944, 2007
- 2. Sven Björnsson, Total Nucleated Cell Differential for Blood and Bone Marrow Using a Single Tube in a Five-Color Flow Cytometer, Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 74B:91–103 (2008)

