

METODICKÉ ASPEKTY FENOTYPIZÁCIE BUNIEK BAL, VÝPOTKOV A INDUKOVANÝCH SPÚT

Andrea Ondrejková

Krajská nemocnice T. Bati a.s., Zlín

„Nehematologický biologický materiál“

- Bronchoalveolárna tekutina, výpotky (exsudáty), ascity, synoviálna tekutina, mozgomiešny mok, spútum...
- **Výhoda** → zastúpenie imunokompetentných buniek podáva informáciu o patologickom procese priamo v postihnutom tkanive →
- Diagnostický resp. pomocný diagnostický význam fenotypizácie bunkových zložiek

Príčina, charakter patologického procesu?

- **Zápalový proces**: infekcie rôznej etiológie (baktérie, vírusy, plesne, parazity...)
- **Malígny proces**: nádory nehematologické (reaktívna tvorba výpotku ako dôsledok nádorového bujnenia)
- **Malígne ochorenie imunitného systému**: leukémie, lymfómy, myelómy... (nález patologických lymfocytov mimo perifériu resp. kostnú dreň)
- **Autoimunitný proces**: pôsobenie imunokompetentných buniek proti vlastným tkanivám (intersticiálne pľúcne procesy, RA...)

BRONCHOALVEOLÁRNA LAVÁŽ

- metóda umožňujúca získať bunečné i nebunečné zložky z **dolných dýchacích ciest a alveolov**
- nenáročná, šetrná, bezpečná a reprodukovateľná metóda, vhodná na posúdenie aktivity ochorenia a efektivity liečby
- **analýza humorálnych zložiek BAL** → málo efektívna, ťažko reprodukovateľná, problémy s kvantifikáciou zložiek
- **analýza bunečných zložiek** → efektívna, diagnostická

BRONCHOALVEOLÁRNA LAVÁŽ

postup

- pri fibrobronchoskopickom vyšetrení sa do postihnutej časti pľúc instiluje 100-300 ml FR zohriateho na 37°C a späť sa aspiruje bronchoalveolárna lavážna tekutina (BAT)
- zmeranie objemu – návratnosť by nemala klesnúť pod 50 %
- filtrácia cez gázu, centrifugácia, premytie buniek
- počítanie leukocytov (klasicky, cytometricky) – **dôležitý údaj odrážajúci intenzitu patologického procesu !**
- analýza buniek mikroskopicky
- fenotypizácia buniek pomocou protilátok

- základný panel: **CD45 / CD14** (diferenciál)
 CD3 / CD4 / CD8 (T-lymfocyty)

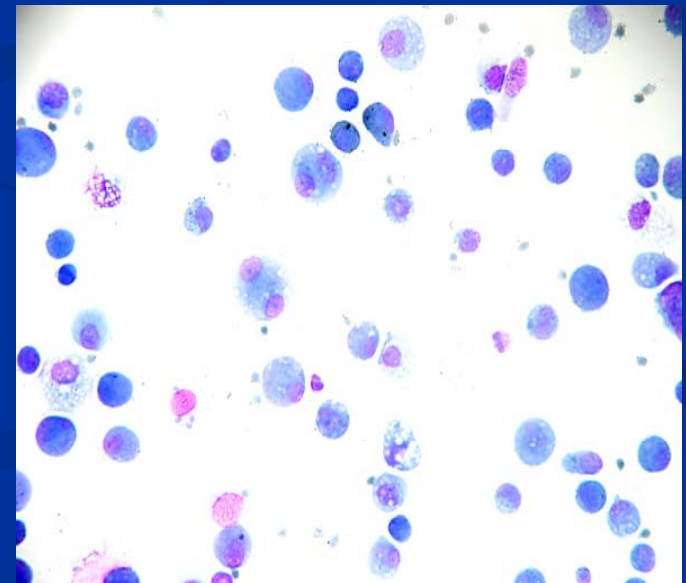
- d'alsie protilátky: **CD16** (v prípade výskytu neutrofilov, eozinofilov)
 HLA DR (marker aktivácie lymfocytov)
 CD19, CD16 (ak nachádzame iné populácie lymfocytov než sú T-ly)
 CD1a (pri podozrení na granulomatózu z Langerhansových buniek)

Vo viac než 90% BAL postačí fenotypizácia BAL základným panelom !

BRONCHOALVEOLÁRNA LAVÁŽ

normálne hodnoty bunkového profilu - nefajčiari

- počet leukocytov : 70 – 150 buniek/ μ l
(variabilný parameter, závislý aj na dráždivosti pacienta, metodike prevedenia bronchoskopie a výplachu, zručnosti bronchológa, u fajčiarov je počet vyšší)
- makrofágy: viac ako 88 %
- lymfocyty: do 12 %
- neutrofily: do 3 %
- eozinofily: do 0,5 %



BRONCHOALVEOLÁRNA LAVÁŽ

diagnostický význam

- **jednoznačný diagnostický význam BAL:**

infekčné ochorenia, pľúcna alveolárna proteinóza, granulomatóza z Langerhansových buniek, zhubné nádory, pľúcna sarkoidóza

- **pomocný diagnostický význam BAL:**

sarkoidóza a iné intersticiálne pľúcne procesy, hypersenzitívne pneumonitídy, eozinofilná pneumónia, azbestóza, berylióza, pľúcna hemoragia

BRONCHOALVEOLÁRNA LAVÁŽ

cytologické výstupy

- **Zvýšenie lymfocytov:** vo viac ako v 90% sa jedná o T-lymfo sarkoidóza (CD4+), iné intersticiálne pľúcne procesy, alveolitidy po viróze, tbc ... lymfoproliferatívne ochorenia (B-lymfo ↑)
- **Zvýšenie neutrofilov:** pozor na prímes periférnej krvi ! bakteriálne pneumónie (masívne), intersticiálne fibrotizujúce pľúcne procesy v pokročilom štádiu (zmiešané alveolitidy)
- **Zvýšenie eozinofilov:** eozinofilná pneumónia, parazitárna pneumónia, aspergilóza, AB
- **Malígne nádorové bunky:** CD45- bronchogénny karcinóm, metastázy solídnych tumorov
- **Inklúzie v alveolárnych makrofágoch:** siderofágy pri pľúcnych hemoragiách, hnedé u fajčiarov, zvéračov, baníkov...

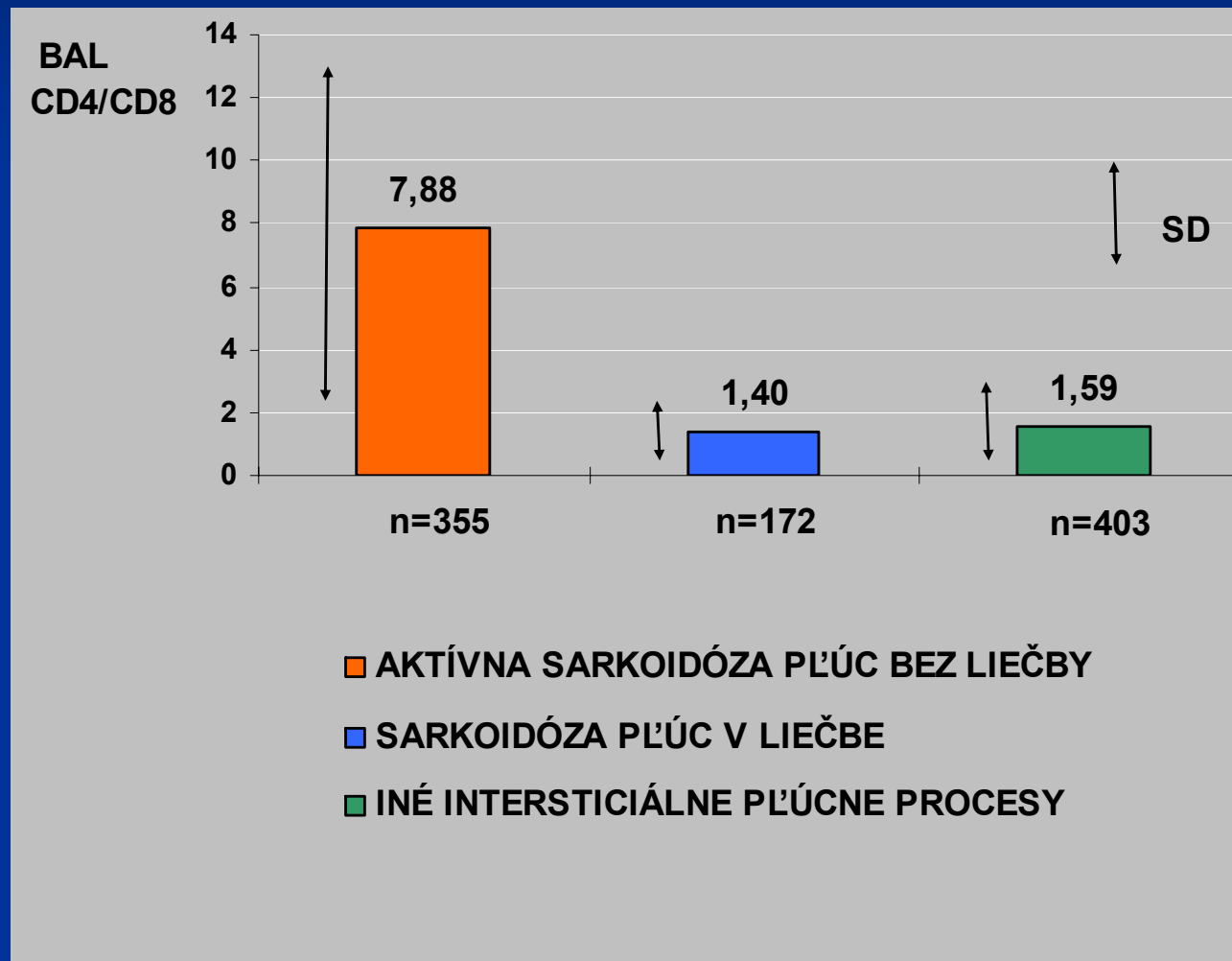
LYMFOCYTÁRNA ALVEOLITÍDA

fenotyp v našom súbore n = 933

- **T – lymfocytárna alveolitída: 930**
(viac než 90,0 % CD3+ T-lymfo v BAL)
- **B – lymfocytárna alveolitída: 2**
- **NK – lymfocytárna alveolitída: 1**

Pomer CD4/CD8 T-lymfocytov v BAL

význam BAL v diagnostike pľúcnej sarkoidózy

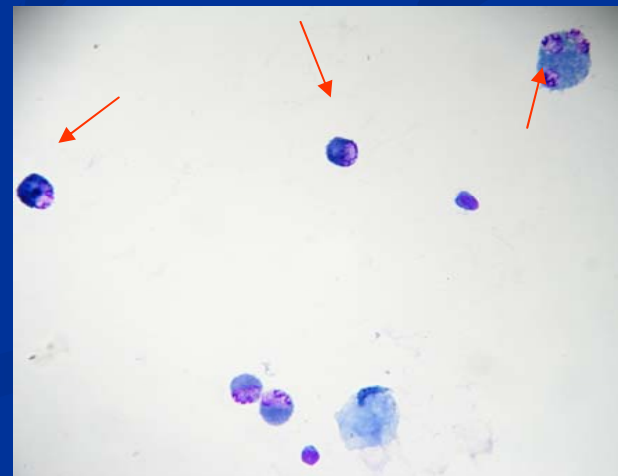
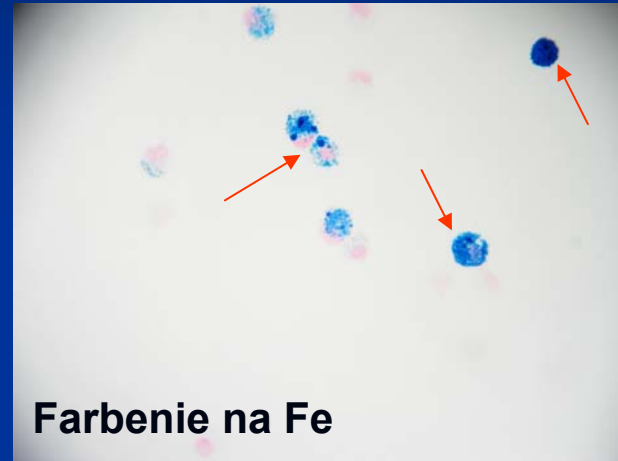
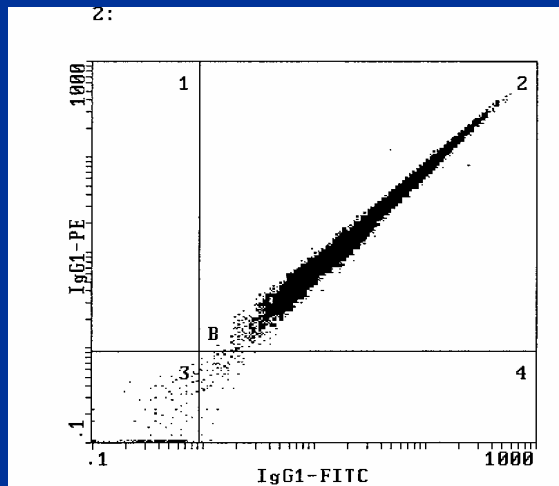


Zaujímavé nálezy v BAL

PLŮCNA HEMORAGIA

inklúzie v makrofágoch / hemosiderofágy

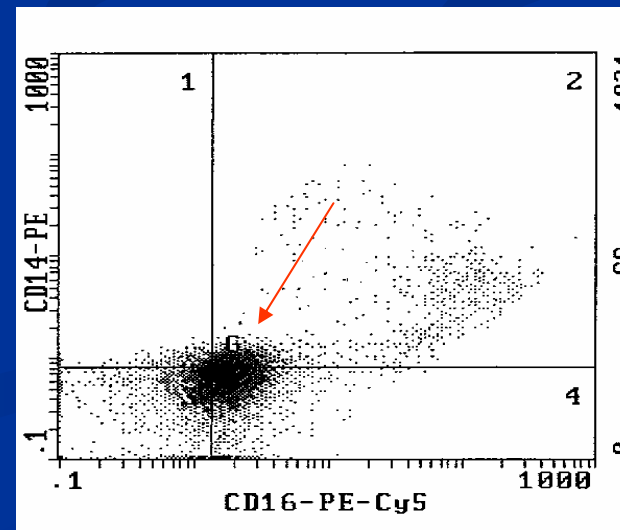
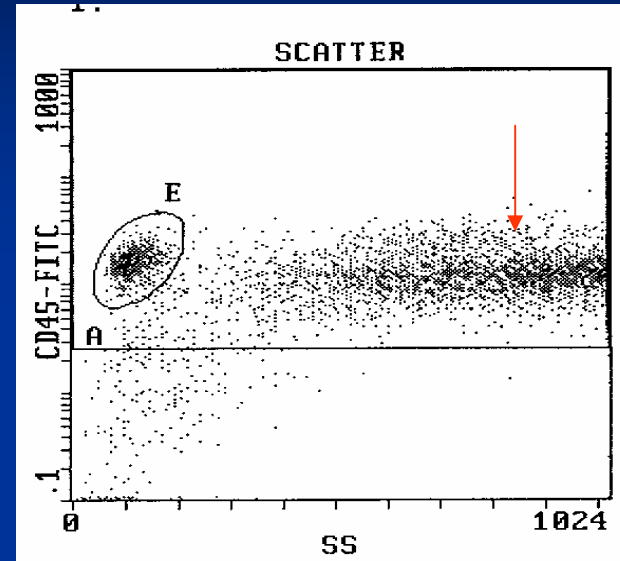
- predomnancia makrofágov v BAL (na prvý pohľad normálne rozloženie buniek)
- intenzívna fagocytárna aktivita makrofágov
- **typická je vysoká autofluorescencia makrofágov**
- hemoragia alebo anorganické častice (fajčiari, zvarači, baníci...)



EOZINOFILNÁ PNEUMÓNIA

- Muž, roč.1947
- Analýza BAL
 - BAL makroskopicky hustá
 - počet buniek: 628 bb/ μ l
 - lymfocyty: 9 % (CD4/CD8: 0,9)
 - makrofágy: 21 %
 - basofily: 2 %
 - **eozinofily: 68 %**
 - cytometrický nález koreluje s mikroskopickým

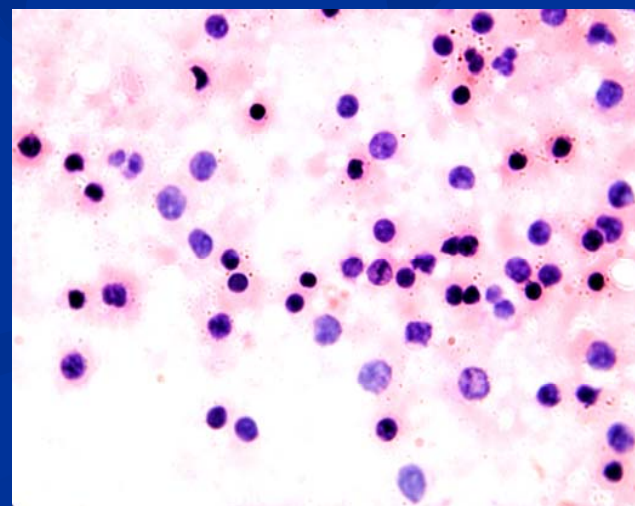
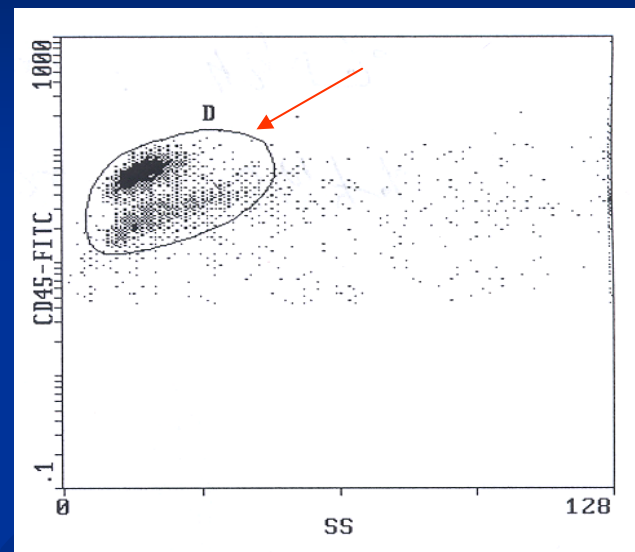
**Obraz výrazného
eozinofilného zápalu**



B - LYMFOPROLIFERÁCIA

výskyt: 2 / 5500 (vlastný zdroj)

- žena, roč. 1934
- lymfocyty: 82,0 % ↑↑↑
CD3+T-ly: 56,2 %
CD19+B-ly: 31,0 % ↑↑
- výrazná **lymfocytárna** alveolitída s **heterogénnou** populáciou lymfocytov, so zvýšeným zastúpením zrelých **B-ly** fenotypu CD19+ CD20+ CD23+/- CD5- CD10- s monoklonálnou povrchovou expresiou ľahkého reťazca **lambda**
- infiltrácia kostnej drene i periferie rovnakým klonom B-lymfo
- FW 114/130, anémia
- paraproteín IgM / L

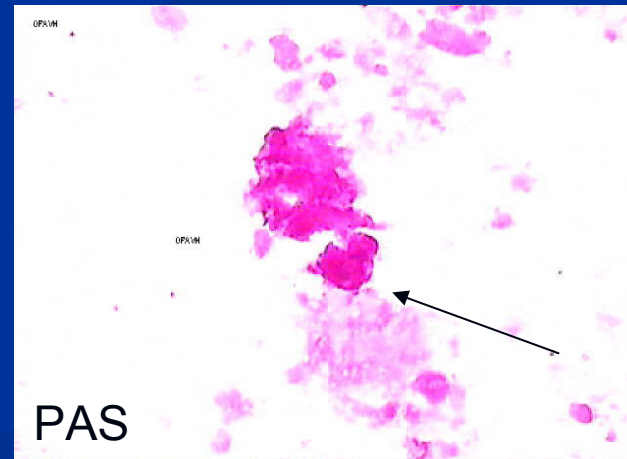
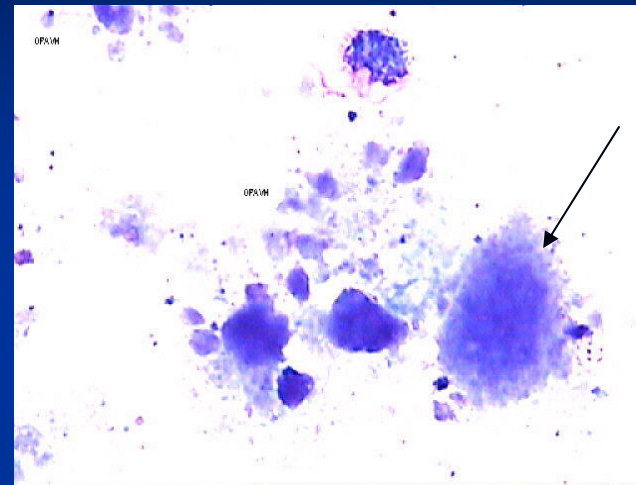


Lymfóm z B-buniek vyššej malignity

ALVEOLÁRNA LIPOPROTEINÓZA

výskyt: 5 / 5500 (vlastný zdroj)

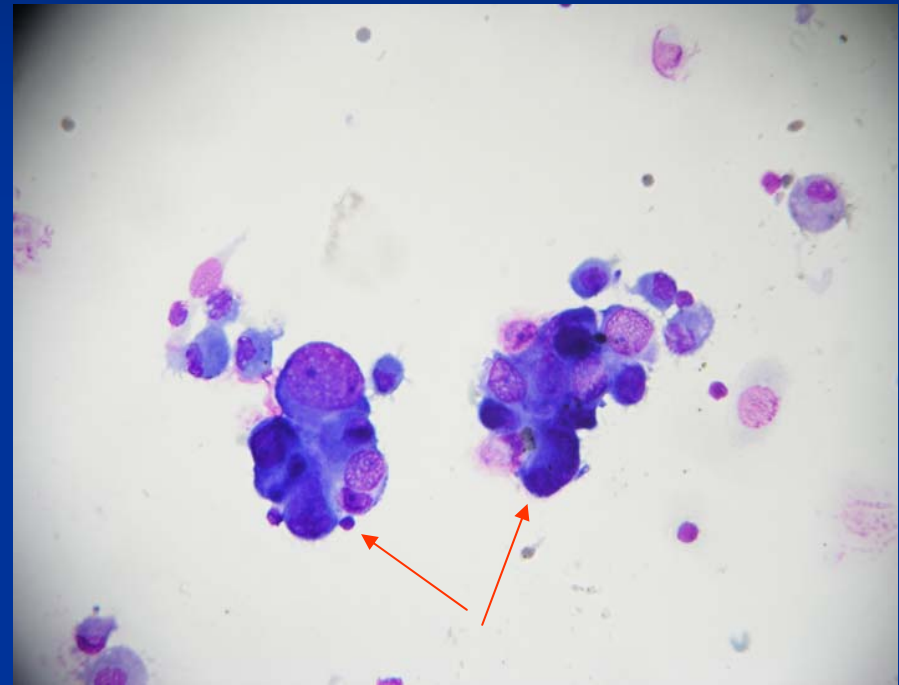
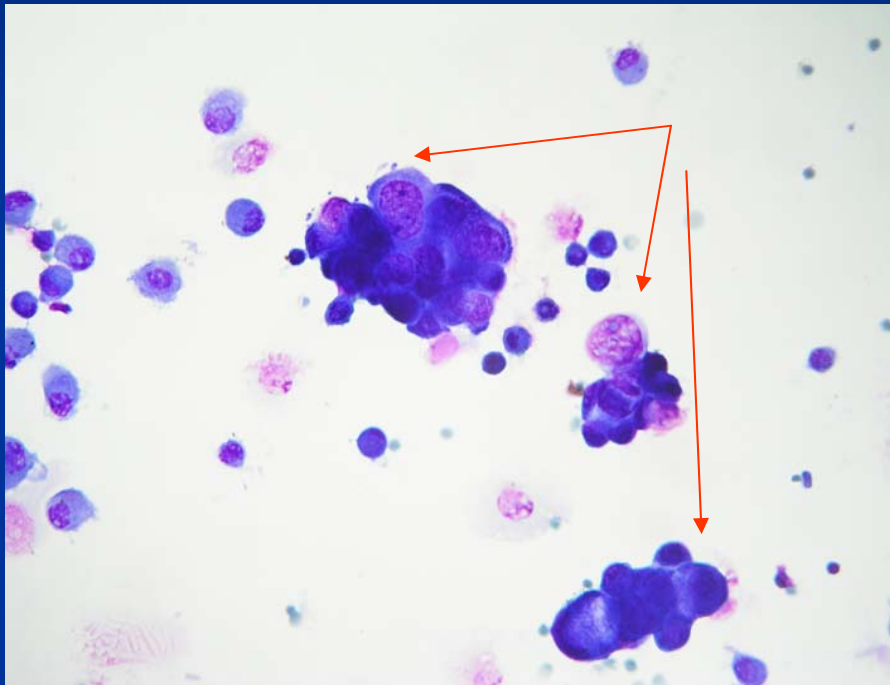
- žena, r.1969
- BALT je makroskopicky hustá, mliečneho vzhľadu
- mikroskopicky zisťujeme prítomnosť cytolyzovaných makrofágov, lymfocytov, bunkovej drte a amorfného **PAS pozitívneho proteinózneho** materiálu



Narušená „úklidová“ funkcia makrofágov

KARCINÓM V BAL

výskyt: 3 / 5500 (vlastný zdroj)



žena, roč. 1951 vyšetovaná pre diseminovaný pľúcny proces nejasnej etiológie: náhodný záchyt **bronchogénneho karcinómu**

VÝPOTKY, ASCITICKÉ TEKUTINY

- materiál (exudáty) z miesta patologického procesu
- príčina je rôzna: infekčný, malígný, autoimunitný proces v postihnutom tkanive
- biochemická analýza má diagnostický prínos (dobre kvantifikovateľná na rozdiel od BAT)
- dôležité postavenie cytológie a fenotypizácie

VÝPOTKY, ASCITY

metodika

- odber do skúmavky s EDTA
- spočítanie leukocytov: **dôležitý údaj odrážajúci intenzitu patol. procesu !**
- optimalizácia koncentrácie buniek pre prietokovú analýzu
- analýza buniek mikroskopicky
- fenotypizácia buniek pomocou protilátok

- základný panel: **CD45 / CD14** (diferenciál)
CD3 / CD4 / CD8 (T-lymfocyty)

- ďalšie protilátky: **CD16** (v prípade výskytu neutrofilov, eozinofilov)
HLA DR (marker aktivácie lymfocytov)
CD19, CD16 (ak nachádzame iné populácie lymfocytov než sú T)

V prevažnej väčšine výpotkov nachádzame v lymfoidnej populácii výraznú prevahu T-lymfocytov

(podobnosť s BAT, výnimkou sú lymfoproliferácie)

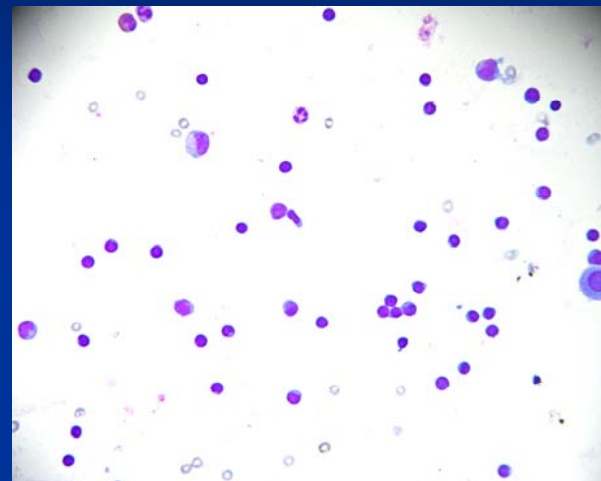
VÝPOTKY

cytologické výstupy

- **Zvýšenie lymfocytov:** T-lymfo - vírusové zápaly, TBC, autoimunitné systémové ochorenia, malígne a paraneoplastické výpotky, B-lymfo - lymfoproliferatívne ochorenia
- **Zvýšenie neutrofilov:** bakteriálne infekcie
- **Zvýšenie eozinofilov:** malígne a paraneoplastické výpotky, parazitárne infekcie
- **Malígne nádorové bunky:** CD45-
malígne výpotky

REAKTÍVNY LYMFOCYTÁRNY VÝPOTOK

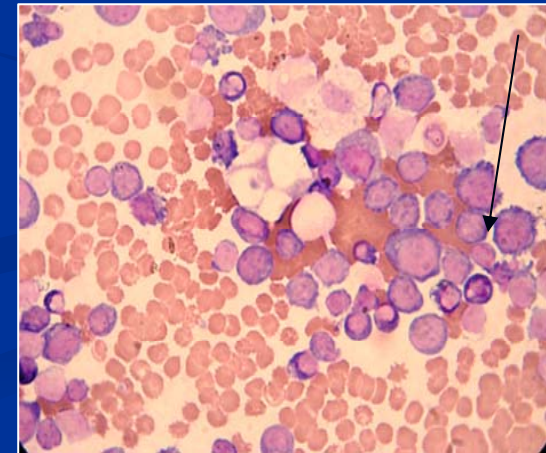
- Pleurálny punktát neznámej etiológie
- Zmiešaná populácia buniek s prevahou lymfocytov (85%), ojedinelé sú neutrofily a eozinofily
- **Fetypizácia:**
CD3+T-ly = 92,5 %,
CD4/CD8 = 2,53
morfológicky i fenotypovo prevažujú **klúdové** lymfocyty
HLA DR-
- Malígne bunky (CD45-) neboli nájsené



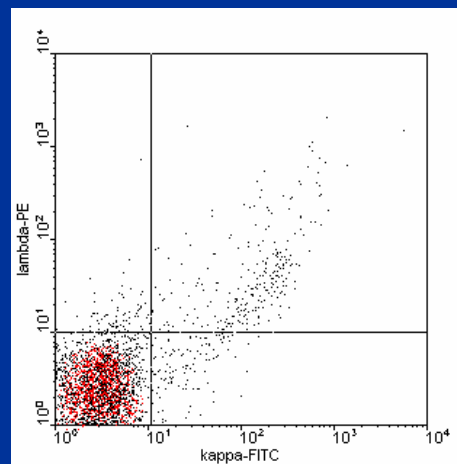
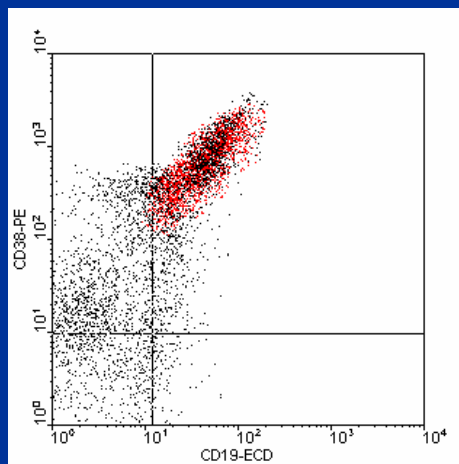
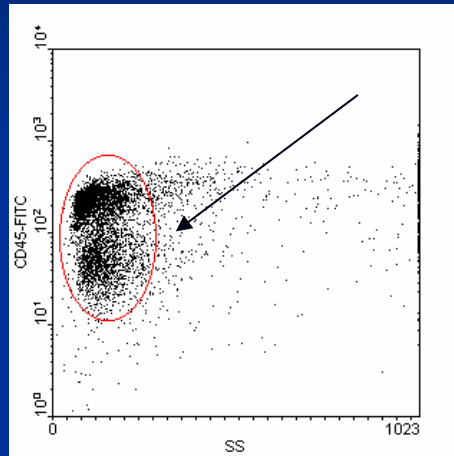
Dif.dg.: paraneoplastický, systémový autoimunitný ?

B - LYMFOPROLIFERÁCIA

- Žena, ročník 1926, opakovane hospitalizovaná pre obojstranný recidivujúci fluidotorax neznámej etiológie, niektoré vyšetrenia viedli k podozreniu na malígne lymfoproliferatívne ochorenie alebo metastázy karcinómu ovária.
- **Biochemické vyšetrenie krvného séra:** celková bielkovina 81,3 g/l, elektroforéza a imunofixácia bielkovín krvného séra vykazuje prítomnosť **paraproteínu typu IgM/lambda o kvantite 58,7 g/l**, znížené sú hodnoty IgG a IgA. Zvýšené sú hodnoty onkomarkerov β 2-mikroglobulínu, TPS a CA 125. Ostatné biochemické vyšetrenia bez signifikantného nálezu.
- **Periférna krv:** v krvnom obraze pretrváva anémia, leukocytóza (13 800 bb/ μ l) s posunom do neutrofilov, výrazná relatívna i početná lymfopénia (3,2% resp. 400 bb/ μ l), bez nálezu lymfoproliferácie.
- **Kostná dreň:** len reaktívne zmeny, zastúpenie lymfocytov je v norme, plazmatické bunky sú len ľahko zmnožené, ale počtom nespĺňajú kritérium mnohopočetného myelómu.
- **Vyšetrenie pleurálneho punktátu:** hemoragická tekutina typu exudátu (bioch.vyšetr.) s počtom buniek 1900 bb/ μ l. Mikroskopicky nachádzame záplavu erytrocytov s množstvom **lymfoidných buniek (84,0 %)**, jadrá sú variabilné s hrubším chromatínom, početné mitózy, početné sú elementy lymfoplazmocytného charakteru.



B - LYMFOPROLIFERÁCIA



- **Fenotypizáciou** zisťujeme heterogénnu populáciu lymfocytov, prevažujú **CD19+ B-lymfocyty** (54,2 %) patologického lymfoplazmocytného fenotypu CD20+/-, CD10-, CD5-, CD23-/+ , CD25+/-, CD38++ (silná intenzita expresie, prevážna časť buniek je bez expresie povrchového Ig)
- **Záver:** známky B-lymfoproliferácie, fenotyp je podobný **lymfoplazmocytnému lymfómu**, v.s. Waldenströмова makroglobulinémia (vzhľadom k tvorbe monoklonového IgM/L).

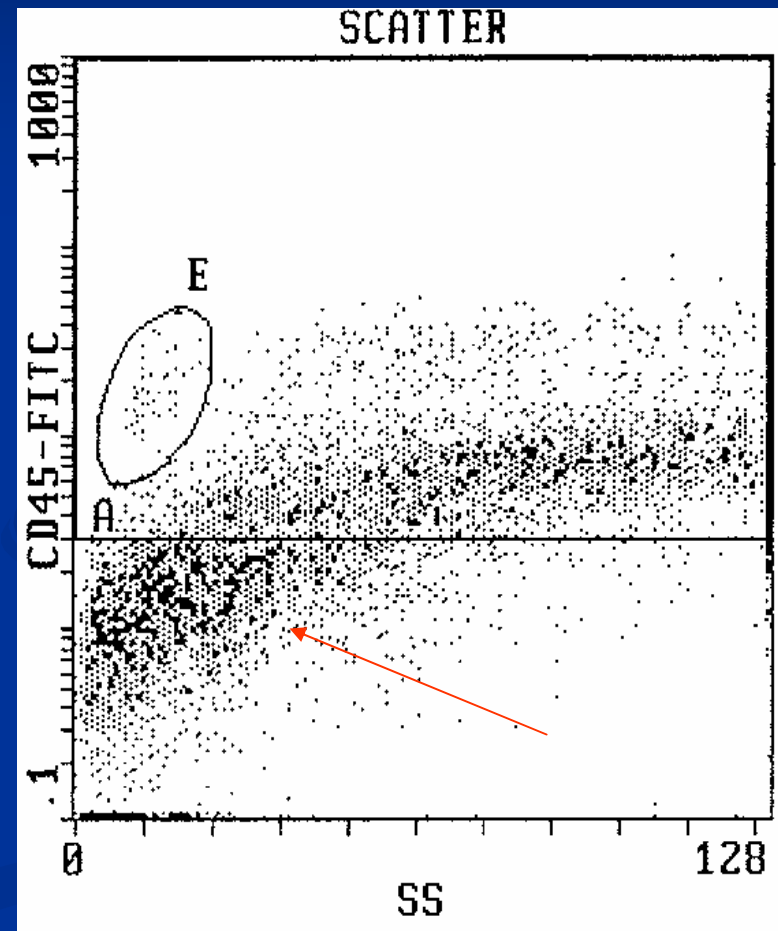
INDUKOVANÉ SPÚTUM

- **Neinvazívne vyšetrenie na monitorovanie zápalu bronchiálnej sliznice**
- **Získava sa inhaláciou hypertonického soľného roztoku (3 – 7 %)**
- **Najväčší význam v diferenciálnej diagnostike má analýza bunkových zložiek indukovaného spúta**
 - **eozinofilný zápal (AB)**
 - **neozinofilný zápal najčastejšie neutrofilný (CHOPCH)**

INDUKOVANÉ SPÚTUM

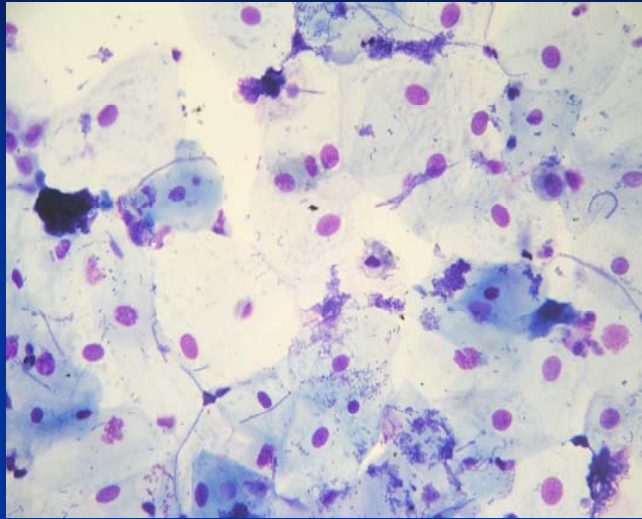
metodika

- Čo najrýchlejšie spracovanie (bunky sú v hypertonickom prostredí)
- Inkubácia s dithiotreitolom
- Filtrácia, centrifugácia a príprava náteru
- Hodnotenie diferenciálneho rozpočtu leukocytov
- Upúšťame od fenotypizácie pre veľké množstvo balastných zložiek (epitelie, bunková drť...), je neúčelová, bez väčšej výpovednej hodnoty

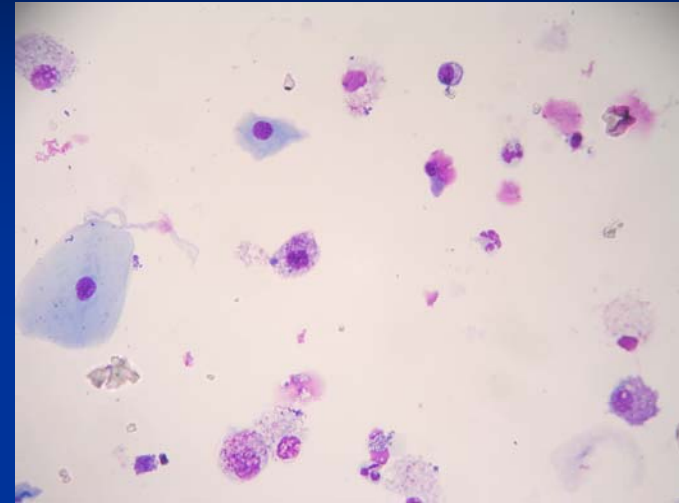


INDUKOVANÉ SPÚTUM

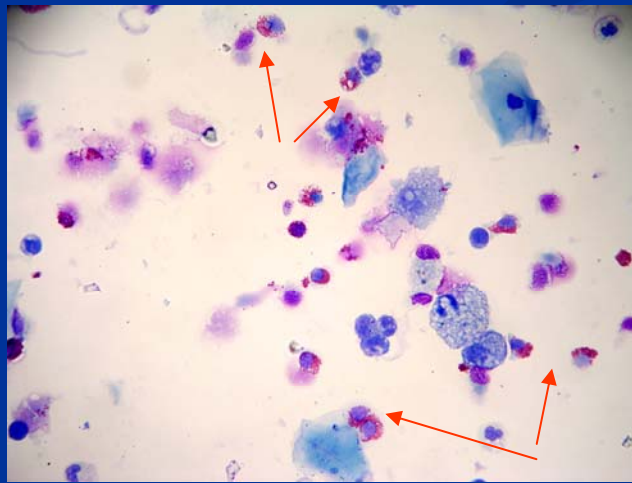
cytologické výstupy



Nehodnotiteľné



Zmiešaný neozinofilný zápal



Eozinofilný zápal

ZÁVER

- ✓ Význam imunofenotypizácie buniek v biologickom materiále získaného priamo z postihnutého miesta
 - ✓ a jej miesto v diagnostike patologických procesov