

LABORATORNÍ LISTY

č. 7/2021



Vážené kolegyně a kolegové,

v dnešním čísle laboratorních listů Vám přinášíme podrobnější informace o přístrojovém stanovení 5 populačního diferenciálu. Příjemné čtení.

PŘÍSTROJOVÉ STANOVENÍ 5 POPULAČNÍHO DIFERENCIÁLU

K rozlišení jednotlivých typů leukocytů se využívají různé detekční metody a jejich kombinace (optické metody, vysokofrekvenční elektrické pole, cytochemické metody, imunofluorescenční metody). Analyzátoři Sysmex využívají optické metody založené na rozptylu laserového paprsku a principu fluorescenční cytometrie.

První komerční využití průtokové cytometrie v hematologii sahá až do 70 let minulého století. Motivací k vývoji průtokové cytometrie byla vysoká statistická chyba a nepřesnost mikroskopie, která za neideálních podmínek počítá málo částic ve velmi malém objemu.

Představení průtokové cytometrie

Pojem průtoková cytometrie je definován jako měření fyzikálně chemických vlastností buněk při jejich průchodu průtokovou kvyetou. Buňky jsou zde ozářeny laserovým paprskem, následně se detekuje rozptyl světla způsobený procházející částicemi a fluorescenční záření vycházející z buněk po obarvení fluorochromy.

Výhody průtokové cytometrie oproti mikroskopickým metodám spočívají ve vyšší přesnosti, citlivosti, specifitě, vysoké spolehlivosti výsledků, vysoké rychlosti měření a jednoduché nebo vůbec žádné předpřípravě vzorku. Vzhledem k vysokému počtu klasifikovaných částic je dosaženo velké přesnosti v počtu buněk.

Princip fluorescenční cytometrie

Vzorek krve je zředěn a aspirován do velmi úzké měřicí kvyety, ve které dojde k rovnoměrnému rozdělení buněk za pomoci hydrodynamické fokusace. Buňky ve vzorku jsou označeny pomocí fluorescenčních barviv, které se specificky vážou na nukleové kyseliny. Objekty (buňky ve vzorku) jsou osvětleny paprskem polovodičového laseru, který způsobí, že světlo (paprsek) změní svou orientaci a dojde k tzv. rozptylu světla. Polovodičový laser vyzařuje červené světlo o vlnové délce 633nm. Výhodou těchto laserů je hlavně životnost a nižší spotřeba energie. Detekce pod různými úhly poté poskytuje informace o velikostech a vlastnostech objektu. Světlo rozptýlené přímo nám umožňuje stanovit velikost objektu (forward scatter light). Bočně rozptýlené světlo (side scatter light) poskytuje informace o vnitřní struktuře buňky. Udává zprávu o absenci či přítomnosti granulí. Boční fluorescence (side fluorescence light) nám podává údaj o množství DNA/RNA, které je přítomné v buňce.



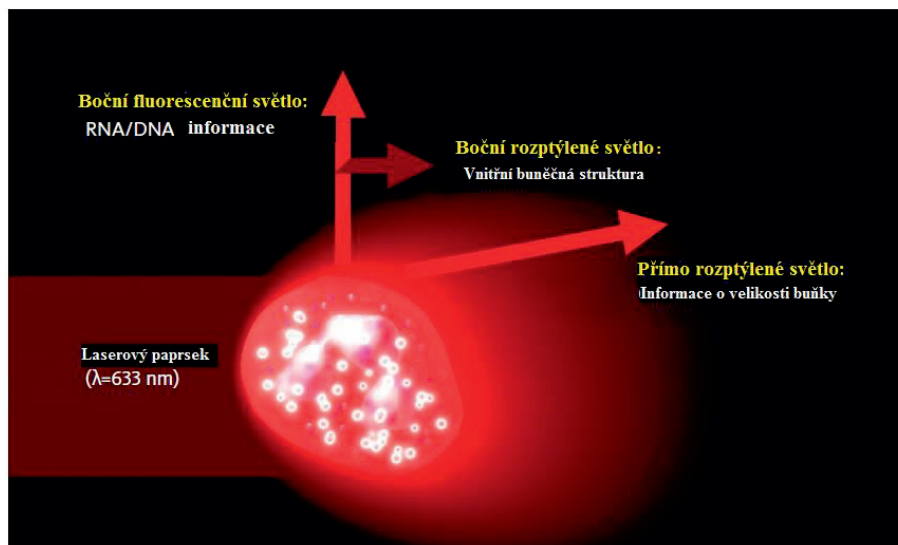
Institut laboratorní
medicíny

Sang Lab - klinická laboratoř, s. r. o.
Bezručova 10, 360 01 Karlovy Vary
Karlovarské imunologické centrum s. r. o.
Bezručova 10, 360 01 Karlovy Vary
TECTUM spol. s r. o.
Bezručova 10, 360 01 Karlovy Vary

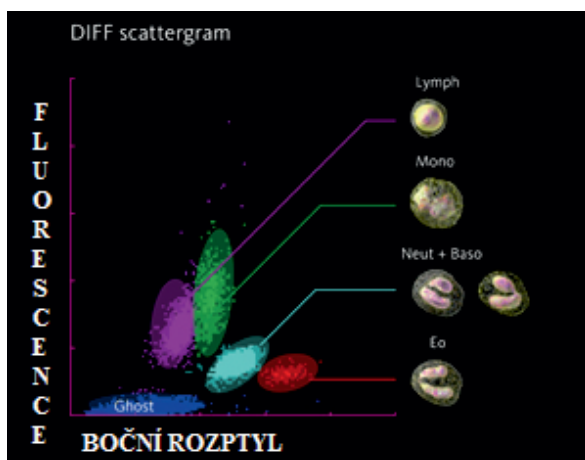
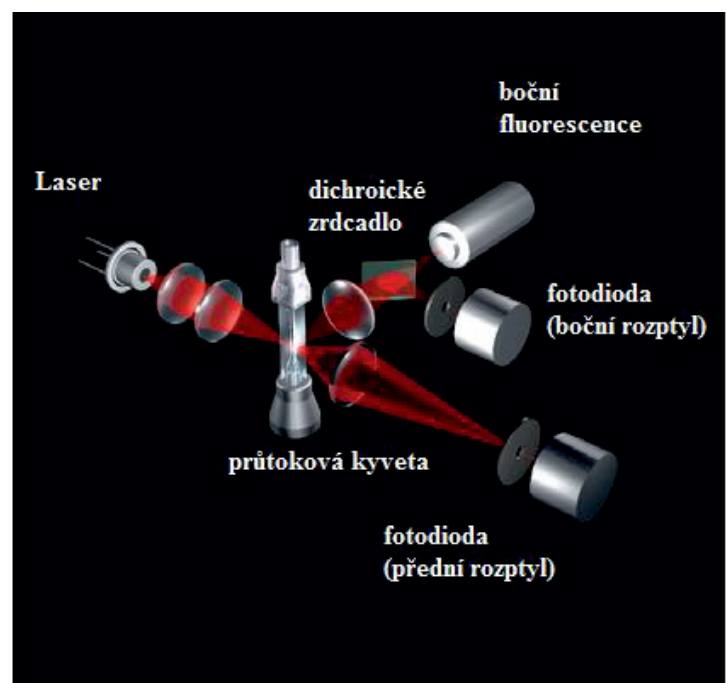
Hematocentrum s. r. o.
nám. Dr. M. Horákové 1313/8, 360 01 Karlovy Vary
VARAPALO s. r. o.
nám. Dr. M. Horákové 1313/8, 360 01 Karlovy Vary
ALERGOAMB s. r. o.
Bezručova 10, 360 01 Karlovy Vary

www.labin.cz

Obr.:Princip fluorescenční průtokové cytometrie



K detekci bočně či přímo rozptýleného světla se používají velmi citlivé fotodiody. Fluorescenční barvivo absorbuje světlo ze světelného zdroje o vymezené vlnové délce. Díky absorpci světelné energie dojde k excitaci elektronů. Po krátkém čase se elektrony vrací na svou základní energetickou hladinu a uvolněná energie je vyzářena ve formě fluorescenčního světla. Množství absorbovaného světla je pak úměrné koncentraci látky, kterou stanovujeme. Měření intenzity fluorescence poskytuje informace o barvitelnosti objektu. U obarvených krevních buněk tak můžeme prokázat obsah nukleových kyselin. V závislosti na použitém barvivu můžeme rozlišovat DNA a RNA nebo obojí. Fluorescenční světlo je vyzařováno všemi směry, proto rušivé signály vznikající přímo dopadajícími laserovými paprsky můžeme eliminovat pomocí detekce na základě bočního úhlu (např. 90°). Pomocí dichroického zrcadla provedeme separaci paprsků a tak jsme schopni rozlišit boční rozptýlené světlo od boční fluorescence.



Jednotlivé typy bílých krvinek jsou po analýze zaznamenávány formou plošných bodových grafů, tzv. **scattergramů**. Jednotlivý bod na scattergramu odpovídá každé snímané buňce. Pomocí počítače a složitých softwarů stanovujeme jednotlivé buněčné populace.

- Použitá literatura:
1. SYSMEX - firemní prospekty
 2. Opletalová. *Bakalářská práce, UK, 2014*