

Experiencia de armonización de dos citómetros de flujo para determinación de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.

Schoepf, M.V; Ambrosi, M.; Giordano, R.; Rodríguez, M.; Seravalle, A; Fay, F.

CIBIC S.A. Centro de Diagnóstico Médico de Alta Complejidad – Pte. Roca 746 – 2000 - Rosario, Argentina. mvschoepf@cibic.com.ar

INTRODUCCION

La Citometría de Flujo Multiparamétrica es en una herramienta diagnóstica valiosa en el estudio de inmunodeficiencias y enfermedades oncohematológicas.

La variedad de instrumentos y reactivos disponibles hacen que se obtengan datos crudos que pueden conducir a diferentes resultados según el criterio del citometrista que los analiza. A lo largo de los años se han diseñado estrategias tendientes a obtener datos comparables entre distintos equipos y laboratorios con el fin de generar la menor variabilidad posible en los resultados informados. El consorcio Euroflow es el mayor ejemplo de esto.

Tomando la estrategia del "Harmonemia Project" realizamos la armonización de las intensidades de fluorescencia entre dos citómetros de flujo de nuestro laboratorio, Navios y Cytomics FC500, ambos de marca Beckman Coulter®.

OBJETIVO:

Armonizar las intensidades de fluorescencia de Navios y FC500, para evaluación de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en 5 colores.

METODOLOGIA

En un primer paso se establecieron los voltajes para cada una de las 5 fluorescencias (FL1, FL2, FL3, FL4 y FL5) en cada equipo adquiriendo una muestra de sangre periférica sin marcar, de manera que las células se encuentren dentro del primer canal de la escala logarítmica (Moda=0,3). Posteriormente se adquirieron las partículas Flow-Set PRO® en FC500 y se evaluaron las intensidades medias de fluorescencia (MFI). Luego se realizó el mismo procedimiento en Navios y se corrigieron los voltajes de manera que las MFI fueran coincidentes con las obtenidas en FC500 (+/- 10) . Finalmente se realizó la compensación de cada citómetro.

Para evaluar si la armonización había resultado adecuada se marcaron 12 muestras de sangre periférica con anticuerpos monoclonales para estudio de subpoblaciones linfocitarias: CD8+CD16 (FITC), CD4 (PE), CD45 (ECD), CD3 (PCy5) y CD19 (PCy7) y se adquirieron en los dos equipos. Posteriormente se compararon las MFI de las poblaciones linfocitarias estudiadas y se realizó una regresión lineal para evaluar el grado de correlación entre las MFI obtenidas.

RESULTADOS

Las regresiones lineales arrojaron Coeficientes de Determinación (R^2) con valores mayores a 0,9 en todos los casos (Tabla1 y Figura 1), lo cual indica un alto grado de correlación de los datos obtenidos. En la Figura 2 se pueden observar los histogramas obtenidos al analizar las subpoblaciones linfocitarias de una muestra con Navios y FC500, superpuestos.

Muestra	FL1		FL2		FL3		FL4		FL5	
	NAVIOS	FC500	NAVIOS	FC500	NAVIOS	FC500	NAVIOS	FC500	NAVIOS	FC500
1	58,88	55,2	37,93	34,99	73,87	68,02	78,23	73,87	32,65	30,65
2	62,75	55,86	36,98	35,92	77,12	74,58	69,15	70,8	27,25	26,26
3	39,67	35,4	33,12	31,6	79,92	77,78	66,73	68,72	30,88	29,57
4	59,26	59,69	39,97	37,97	79,71	74,36	78,75	78,23	32,91	30,09
5	42,53	41,79	29,68	28,41	64,99	61,1	49,24	48,6	32,29	30,06
6	46,7	46,06	30,8	29,16	77,79	73,12	68,56	66,35	34,37	32,01
7	40,6	35,33	23,08	22,54	63,88	63,79	46,61	48,3	25,4	24,29
8	56,65	64,38	39,3	41,48	101,49	100,69	94,96	98,73	32,09	31,16
9	72,45	82,8	51,72	54,04	121,8	121,02	118,13	122,75	29,44	28,04
10	56	60,37	43,44	44,2	111,37	109,48	103,81	108,01	33,17	31,59
11	69,92	79,19	23,03	23,43	113,74	111	88,81	91,02	35,8	32,88
12	76,39	86,49	45,78	45,8	91,98	87,19	85,8	87,67	27,77	26,35

Tabla 1: Comparación de las MFI obtenidas de las 12 muestras analizadas, para cada fluorescencia.

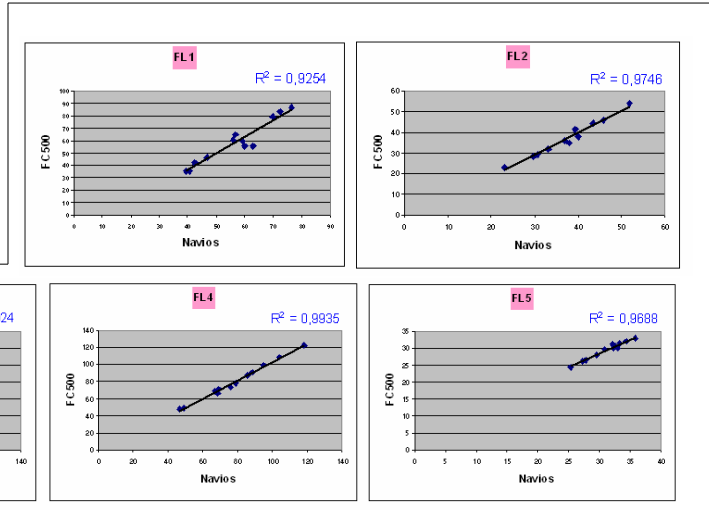


Figura 1: Se aprecian los gráficos de regresión lineal y sus respectivos coeficientes R^2 . Arriba: FL1 y FL2. Abajo: FL3, FL4 y FL5.

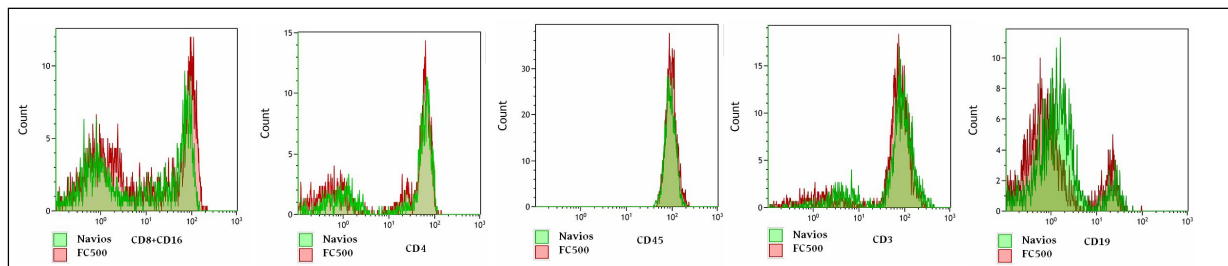


Figura 2: Superposición de histogramas de FC500 y Navios, para una dada muestra.

CONCLUSION

Mediante esta experiencia concluimos que es posible armonizar dos citómetros de flujo de diferentes tecnologías como primer paso en la sistematización del análisis de los datos obtenidos en el estudio de subpoblaciones linfocitarias.