

Especializaciones

Resultados de la implementación del Tubo de Screening Linfocitario (LST Oneflow) por citometría de flujo en tres laboratorios de diagnóstico Oncohematológico de Argentina

Autores: Bordón S¹; Cismondi V²; Fanessi V²; Issouribehere D²; Martin B³; Serpp C³; Alvaro Sopena E⁴; Rodriguez C¹. ¹Hospital Nacional de Clínicas. Córdoba. ²Hospital El Cruce. Buenos Aires. ³Laboratorio CEBAC SRL. Misiones. ⁴BD Biosciences. Argentina.

Abstract

Immunophenotyping protocols generally include ≥ 8 -color tubes, combining multiple antibodies allowing precise characterization of normal and neoplastic leukocyte populations. The EuroFlow group has designated and evaluated an 8 color, 12 marker combination of antibodies for the detection of normal and aberrant populations of mature B, T and NK cells in peripheral blood (PB), bone marrow, and other tissues. The Lymphoid Screening tube (LST) in a dried single-test tube format, has recently been developed (OneFlow™ LST, BD Bioscience). In this study, we evaluated the OneFlow LST tube on three Argentinian Laboratories (Cordoba, Buenos Aires and Misiones) and median fluorescence intensity (MIF) values for individual markers on defined lymphocyte subsets were recorded, using BD FACSCanto II flow cytometers and Infinicyt 1.7 software (Cytognos SL). We also calculated biological reference intervals for Lymphocyte Subpopulations of 43 adult healthy donors. The results demonstrated that MIF values were highly comparable for most of markers at different laboratories by following the standardized EuroFlow protocols, except for Smlg kappa and TCR that showed more heterogeneity. However, in an automated population separator (APS) plot, tool of the Infinicyt software, showed highly overlapping populations, indicating that variations seen for some individual markers did not significantly impact the identification of the corresponding cell populations via multidimensional analysis. All data files obtained were merged and biological reference values calculated as mean \pm standard deviation (SD) and rank for CD19+ B cells, CD19+kappa+ B cells, CD19+lambda+B cells, kappa/lambda ratio, CD3+T cells, CD3+CD4+T cells, CD3+CD8+T cells, CD4/CD8 ratio, CD3+TCR T cells and CD3-CD56+ NK cells. There was no significant difference between men and women and all lymphocytes subsets showed normal distribution except in TCR T cells.

In summary, this study shows that using 8 colours LST dried tube following Euroflow protocols in standardized laboratories allows comparable MIF for individual markers on defined lymphocyte subsets like mature B, T and NK cells of peripheral blood. Moreover, there are scarce information in the literature about Lymphocytes subsets reference values, using OneFlow LST tube. Finally, we highlight how the LST dried format tube favors preanalytic work, reducing potential errors and avoiding the need to assess and monitor individual antibodies.

Key words: flow cytometry, Euroflow, lymphocyte population, OneFlow LST

Resumen

Los protocolos de inmunofenotipificación generalmente incluyen tubos de ≥ 8 colores, combinando múltiples anticuerpos que permiten una precisa caracterización de poblaciones de leucocitos normales y neoplásicos. El grupo EuroFlow ha designado y evaluado una combinación de 12 anticuerpos con 8 fluorocromos para la detección de poblaciones normales y aberrantes de células B, T y NK en Sangre Periférica (PB), Médula Ósea y otros tejidos. El tubo de Screening Linfocitario (LST) en formato seco, se ha desarrollado recientemente (OneFlow™ LST, BD Bioscience). En este estudio, evaluamos el tubo OneFlow LST en tres laboratorios argentinos (Córdoba, Buenos Aires y Misiones) y se analizaron los valores de Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) para marcadores individuales en subgrupos definidos de linfocitos, utilizando citómetros de flujo BD FACSCanto II y el software Infinicyt 1.7 (Cytognos SL). También calculamos los intervalos de referencia biológica para las subpoblaciones linfocitarias de 43 adultos sanos. Los resultados demostraron que los MIF eran altamente comparables para la mayoría de los marcadores en los diferentes laboratorios al seguir los protocolos estandarizados de EuroFlow, excepto Smlg kappa y TCR que mostraron mayor heterogeneidad. Sin embargo, en el gráfico separador automático de poblaciones (APS), herramienta del software Infinicyt, se mostraron poblaciones altamente superponibles, lo que indica que las variaciones observadas para algunos marcadores individuales no tuvieron un impacto significativo en la identificación de las poblaciones de células correspondientes mediante el análisis multidimensional. Todos los archivos de datos obtenidos se fusionaron y los valores de referencia biológicos se calcularon como Media \pm Desviación Estándar (SD) y rango para células B CD19+, células B kappa+ CD19+, células B lambda+ CD19+, relación kappa/ lambda, células T CD3+, células T CD3+ CD4+, células CD3+ CD8+, relación CD4/CD8, células T CD3+ TCR + y células NK CD3-CD56+. No hubo diferencias significativas entre hombres y mujeres y todas las subpoblaciones de linfocitos mostraron una distribución normal, excepto las células TCR .

En resumen, este estudio muestra que el uso del tubo seco LST siguiendo los protocolos de Euroflow en laboratorios estandarizados permite un MIF comparable para marcadores individuales en subpoblaciones definidas de linfocitos como células maduras B, T y NK en SP. Además, hay poca información en la literatura sobre los valores de referencia biológica de las subpoblaciones linfocitarias, utilizando el tubo OneFlow LST.

Finalmente, destacamos cómo el tubo LST en formato seco disminuye los errores de la etapa preanalítica, reduciendo errores potenciales y evitando la necesidad de evaluar y titular anticuerpos individuales.

Palabras Claves: Citometría de Flujo, Euroflow, población linfocitaria, OneFlow LST.

Introducción

El inmunofenotipo cumple un rol esencial en la identificación, cuantificación y caracterización de células neoplásicas, en Leucemias y Linfomas. Por tal razón, la Citometría de flujo (CF) multiparamétrica es una herramienta indispensable en el diagnóstico y seguimiento de Enfermedades Oncohematológicas (1).

La estandarización de la inmunofenotipificación es fundamental para optimizar el diagnóstico y clasificación de neoplasias hematológicas, para lo cual el consorcio científico Euroflow ha desarrollado nuevos paneles con combinaciones de anticuerpos y fluorocromos y protocolos de trabajo con el fin de lograr una mejor caracterización de poblaciones específicas de células normales y neoplásicas en Sangre Periférica (SP), Médula ósea (MO) y otros tipos de tejidos. (2,3)

Entre los paneles diseñados por Euroflow, el tubo de screening linfocitario (LST) es utilizado con el fin de identificar y caracterizar fenotípicamente poblaciones linfocitarias normales y patológicas de estirpe T, B y NK, utilizando una combinación de 12 anticuerpos conjugados con 8 fluorocromos, de gran utilidad en el estudio de Desórdenes Linfoproliferativos. Actualmente, el tubo LST líquido ha sido optimizado en formato seco (Oneflow BD) con el fin de evitar errores operacionales y reducir la variabilidad de la marcación entre diferentes muestras debido a la prolongada estabilidad de la mezcla en el tubo seco, lo que contribuye a optimizar los resultados. (4,5,6)

Objetivos:

- 1) Implementar el tubo LST seco siguiendo los protocolos estandarizados de Euroflow en 3 laboratorios de diagnóstico Oncohematológico de la Argentina y comparar las medianas de intensidad de fluorescencia (MIF) para los 12 marcadores utilizados entre los 3 centros.
- 2) Establecer intervalos de referencia biológica para subpoblaciones linfocitarias en individuos adultos sanos utilizando el tubo LST.

Materiales y Métodos

Muestras:

Se procesaron un total de 43 muestras de SP de adultos sanos, con una media de edad de 46 años (23 mujeres y 20 varones). Las muestras fueron obtenidas de 3 laboratorios de la Argentina: Laboratorio de Oncohematología del Hospital Nacional de Clínicas -

Córdoba, Laboratorio CEBAC SRL- Misiones y Laboratorio del Hospital El Cruce- Buenos Aires.

Protocolos de Tinción:

Todas las muestras se procesaron de acuerdo con el Procedimiento Operativo Estándar (SOP) de EuroFlow, que incluía tinción de Inmunoglobulinas de superficie (7,8). Brevemente, se tomaron 300 ul de muestra en un tubo de Falcon de 15 ml, con un recuento de glóbulos blancos de hasta 2×10^7 cel/ml. Se lavaron 3 veces utilizando un buffer de lavado (PBS filtrado + BSA al 0.5% + NaN_3 al 0.1%) dejando un volumen final de 300 ul. Posteriormente se agregó 100 ul al tubo BD OneFlow LST y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Se lisó con la solución FACS Lysing, se incubó y volvió a lavar con el Buffer de lavado. Finalmente, se resuspendió la muestra en 500 ul de FACSSlow. El Tubo LST contiene 12 anticuerpos monoclonales combinados con 8 fluorocromos (9). (Tabla 1)

V450	V500c	FITC	PE	PerCP-Cyanine 5.5	PE-Cyanine 7	APC	APC-H7
CD20+CD4	CD45	CD8+Smlg	CD56+Smlg	CD5	CD19+TCR	CD3	CD38

Tabla 1. Panel de anticuerpos en el tubo LST.

Análisis por Citometría de Flujo:

Las muestras fueron adquiridas en citómetros de flujo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences), con óptica de 3 láser y 8 colores. Se adquirieron 200.000 eventos totales para cada tubo LST. Los ajustes del instrumento y la adquisición de datos se realizaron siguiendo el SOP específico de EuroFlow. Los Ajustes de voltajes se realizaron con el reactivo BD Oneflow Setup beads, la Compensación con los tubos FC Beads y diariamente se pasó el control de calibración con las perlas BD™ Cytometer Setup and Tracking (CST). El análisis posterior fue realizado con el software Infinicyt™1.7.

Análisis de los datos:

Los 43 archivos de los 3 laboratorios se analizaron en conjunto utilizando la herramienta de Infinicyt, *Fusión de Archivos*, comparándose las MIF de CD3, CD4, CD8 para Linfocitos T, CD19, CD20, kappa y lambda para linfocitos B y CD56 para células NK con la herramienta de análisis, *Separador Automático de Poblaciones* (APS). Para calcular los intervalos de referencia biológica se utilizaron planillas de cálculo de Excel y el programa Infostat (2016e) (10) para la detección de valores anómalos que fueron removidos finalizado el análisis, mientras que para el estudio de normalidad de los datos se aplicó el Test de Shapiro Wilks modificado. Se procedió finalmente a realizar un estudio descriptivo para obtener los valores de media, mediana, desviación estándar, coeficiente de variación, mínimo, máximo e intervalos de confianza del 95% para las

diferentes subpoblaciones linfocitarias de las muestras de SP de adultos sanos. También se aplicó el Test t para muestras independientes.

Resultados

La identificación de las distintas poblaciones linfoides normales se realizó según su perfil fenotípico siguiendo la estrategia de análisis como se muestra en la Figura 1:

CD45+CD3+CD5+ (Linfocitos T)

CD45+CD3+CD5+TCR + (Linfocitos T)

CD45+CD3+CD5+TCR -CD4+CD8- (Linfocitos T)

CD45+CD3+CD5+TCR -CD4-CD8+ (Linfocitos T)

CD45+CD3-CD5-CD19+CD20+ (Linfocitos B)

CD45+CD3-CD5-CD19+CD20+smlg +smlg (Linfocitos B)

CD45+CD3-CD5-CD19+CD20+smlg smlg (Linfocitos B)

CD45+CD3-CD5-CD19-CD20-CD56+ (Células NK)

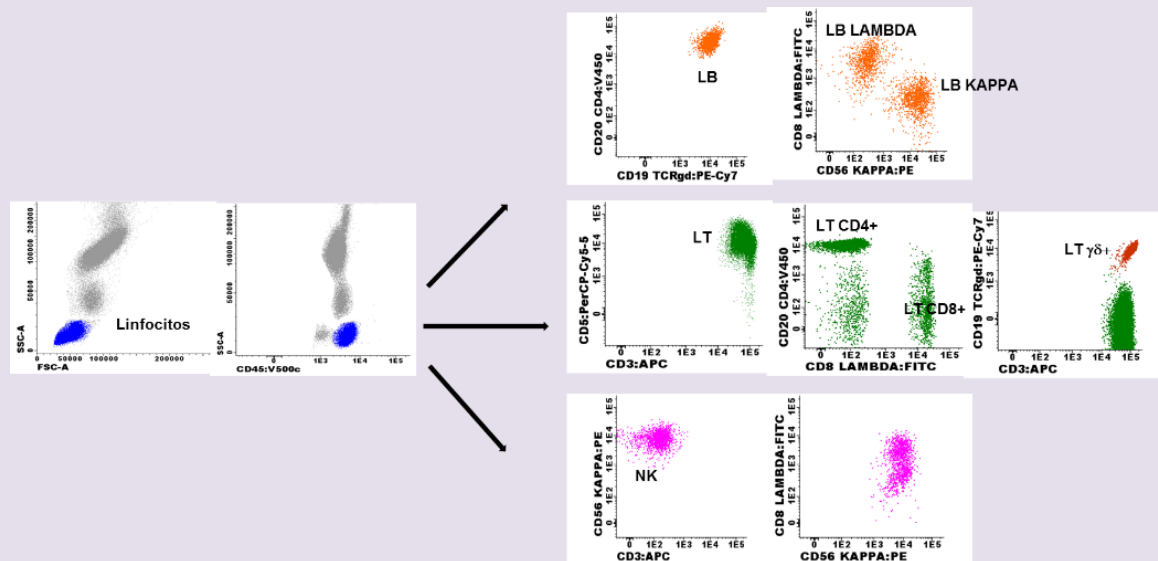
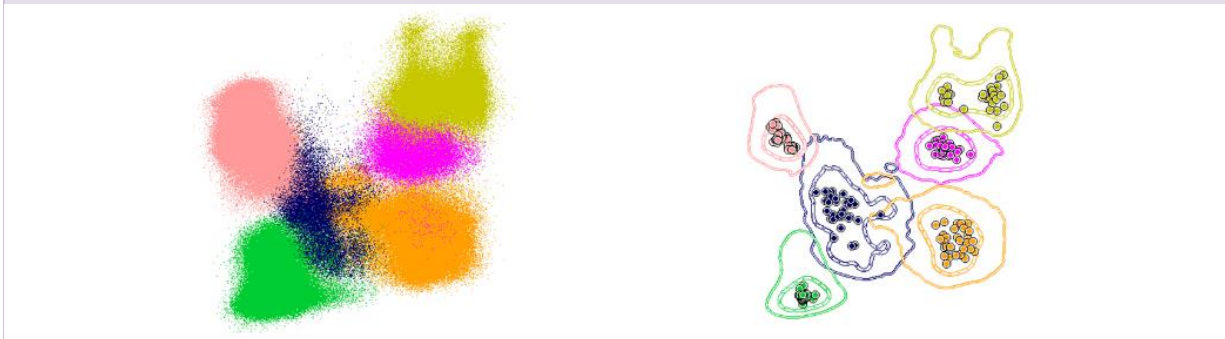


Figura 1. Representación gráfica de la estrategia de selección de poblaciones linfocitarias. Gráficos biparamétricos (Dotplots) que ilustran las poblaciones seleccionadas en el Tubo de Screening LST. CD45 identifica linfocitos maduros; CD3 identifica células T, Anti-TCR CD5, CD4 y CD8 permite dividir células T en distintas subpoblaciones; CD19 y CD20 identifican células B maduras, Anti-Kappa y Anti-Lambda identifican poblaciones de células B normales y clonales expresando Ig-k y/o Ig-l a nivel de membrana y CD56 identifica células NK.

Cuando se compararon las MIF de los antígenos que identifican las distintas poblaciones linfocitarias, se obtuvieron poblaciones definidas comprendidas dentro de 1 desvío estándar (SD) en los gráficos APS: CD3, CD4, CD8 para linfocitos T, CD19, CD20, kappa y lambda para linfocitos B y CD56 para células NK en todas las muestras (Figura 2).



APS 1

APS 1

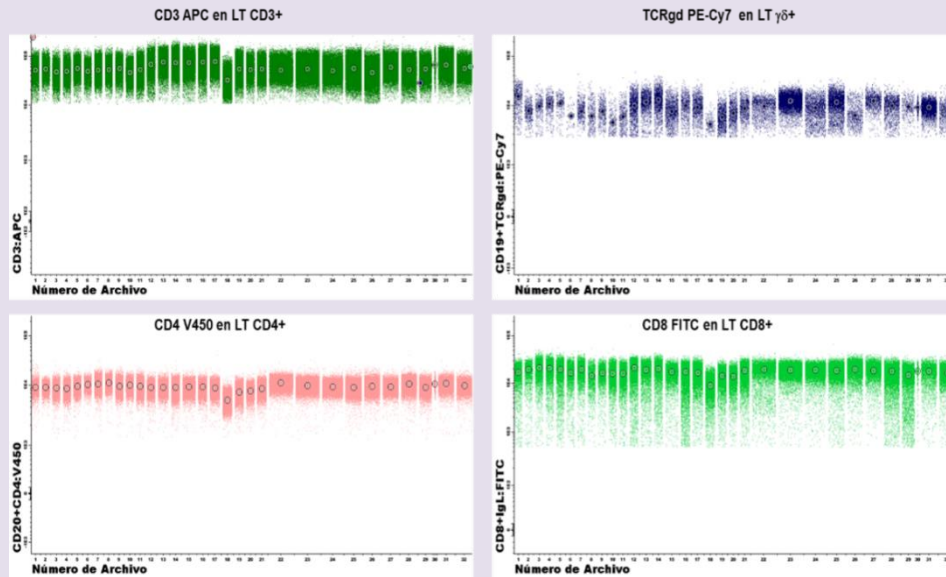
- LT CD4+
- LT CD8+
- LT $\gamma\delta$ +
- LB KAPPA
- LB LAMBDA
- NK

Puntos: MIF
Líneas: 1 y 2 SD

Figura 2. Representación gráfica de las distintas poblaciones linfocitarias. Gráfico multidimensional (APS) donde se ilustran las poblaciones linfocitarias LTCD4+, LTCD8+, LT LB kappa, LB lambda y células NK.

En el análisis de los gráficos de banda, las MIF de estos marcadores arrojaron valores dentro de un rango homogéneo para todas las muestras, a excepción del antígeno kappa que presentó mayor variabilidad. (Figura 3A y 3B).

3A)



3B)

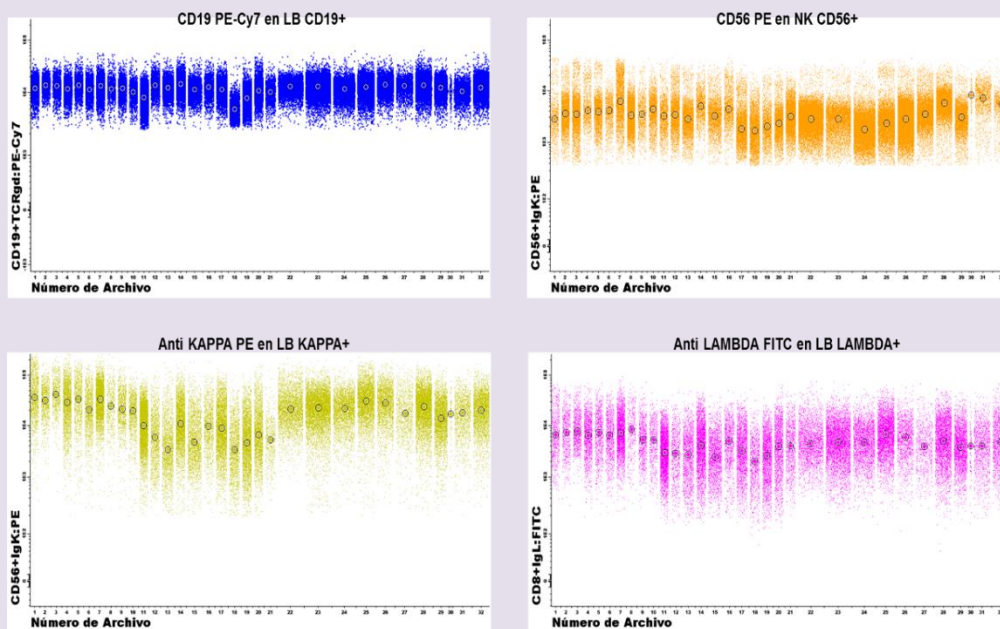


Figura 3. Gráficos de bandas donde se representa la MIF para cada marcador: A) CD3 APC en LT CD3+, TCR PE-Cy7 en LT CD4 V450 en LT CD4+, CD8 FITC en LT CD8+. B) CD19 PE-Cy7 en LB CD19+, Anti-Kappa PE en LB kappa+, Anti-lambda FITC en LB lambda+, CD56 PE en NK CD56+.

Análisis estadístico de poblaciones linfocitarias normales.

Todas las poblaciones linfocitarias analizadas (n=43) presentaron distribución normal (test Shapiro Wilks) excepto la población de Células T y los valores anómalos (outliers) fueron descartados del análisis descriptivo. Con respecto al Test t para muestras independientes se concluyó que no existían diferencias significativas cuando se compararon las variables según el sexo ($p > 0,05$.) De dicho análisis descriptivo y teniendo en cuenta que el análisis fue realizado en el 100% de Linfocitos Totales, se obtuvieron para las principales poblaciones linfocitarias los siguientes parámetros: Media \pm SD e Intervalo de Referencia Biológica como se muestra en la Tabla II.

Tabla II. Intervalos de Referencia Biológica para Subpoblaciones Linfocitarias.

Población Celular	Población de Referencia	Media (%) \pm SD Intervalo de Referencia Biológica
Linfocitos	Leucocitos	31,42 \pm 8,63 28,25-34,58
Células B	Linfocitos	12,47 \pm 6,06 10,61-14,34
Células B kappa	Células B	7,42 \pm 3,66 6,29-8,54
Células B lambda	Células B	4,9 \pm 2,29 4,19-5,61
Relación kappa/lambda	Células B	1,48 \pm 0,24 1,41-1,55
Células T	Linfocitos	75,61 \pm 7,17 73,4-77,82
Células T CD4+	Células T	43,72 \pm 6,48 41,67-45,77
Células T CD8+	Células T	27,22 \pm 8,09 24,73-29,71
Relación CD4/CD8	Células T	1,73 \pm 0,68 1,51-1,94
Células T	Células T	2,32 \pm 1,36 1,89-2,74
Células NK	Linfocitos	10,35 \pm 5,57 8,57-12,13

Discusión y Conclusión:

En este trabajo se obtuvieron resultados comparables de MIF para los 12 marcadores utilizados en el Tubo LSTseco en 3 laboratorios de Oncohematología del país, destacándose la importancia de la estandarización en la etapa preanalítica y analítica de la inmunofenotipificación de linfocitos siguiendo los protocolos recomendados por Euroflow.

También se obtuvieron intervalos de referencia biológica en subpoblaciones linfocitarias en adultos sanos utilizando el tubo seco LST. Con respecto a los resultados al no existir diferencias significativas según el sexo, no se usaron criterios de exclusión y se generaron las tablas con los datos de los 43 adultos sanos. Estos resultados son sumamente valiosos debido a la escasa información bibliográfica sobre intervalos de referencia biológica en subpoblaciones linfocitarias con este nuevo sistema de marcación que combina 12 anticuerpos y 8 fluorocromos.

Por último, la combinación de anticuerpos utilizada en el tubo LST permitió discriminar células normales de patológicas, basado en la detección de fenotipos aberrantes en pacientes con linfocitosis (datos no mostrados). Estas poblaciones fueron posteriormente caracterizadas y clasificadas fenotípicamente siguiendo las recomendaciones de Euroflow.

Agradecimientos:

A la Dra. Verónica Baroni del Depto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, ICYTAC CONICET-UNC por su colaboración en el análisis estadístico.

Bibliografía

1. Van Dongen J, Orfao A. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. *Basisforcompaniondiagnostics and personalized medicine. Leukemia.* 2012; 26: 1899.
2. Kalina T, Flores-Montero J, Lecomte Q, Pedreira CE, van derVelden V, et al. Quality assessment program for EuroFlow protocols: summary results of four-year (2010-2013) quality assurance rounds. *Cytometry A* 2015; 87:145.
3. Van Dongen J, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden V, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012; 26: 1908.
4. Costa E, Pedreira C, Barrena S, Lecomte Q, Flores J, et al. Automated pattern-guided principal component analysis vs expert-based immunophenotypic classification of B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a step forward in the standardization of clinical immunophenotyping. *Leukemia* 2010; 24: 1927.

5. Van der V, Flores-Montero, Perez A, Martin M, Crespo O et al. Optimization and testing of dried antibody tube: The EuroFlow LST and PIDOT tubes as examples. *Journal of Immunological Methods* 2017; 17:1530.
6. Pedreira C, Costa E, Lecrevisse Q, van Dongen J, Orfao A. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends Biotechnol* 2013; 7: 415.
7. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012; 9: 1986.
8. <https://www.euroflow.org/usr/pub/prlogin.php>.
9. <https://www.bdbiosciences.com/documents/BD-OneFlow-LST-Manual.pdf>
10. INFOSTAT. Software estadístico, Grupo de estadística aplicada, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. (www.infostat.com.ar)
11. Cismondi V, Fanessi V, Issouribehere D, Martin B, Serpp C, AlvaroSopuerta E, Bordon S, Rodriguez C. Implementación del sistema de marcación BD OneFlow™ por Citometría de Flujo en tres laboratorios de diagnóstico oncohematológico de Argentina. Poster SAH 2017.