

Desempenho do citômetro de fluxo Aquios CL na quantificação automatizada de subpopulações linfocitárias

Aquios CL flow cytometer performance in the automated quantification of lymphocyte subpopulations

Laiz C. Bento; Rodolfo P. Correia; Eduardo C. Pedro; Anderson M. Alexandre; Andressa C. Vaz; Daniela Schimidell; Rodrigo S. Barroso; Nydia S. Bacal

Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO

A citometria de fluxo (CF) é uma ferramenta importante para diagnóstico, prognóstico e acompanhamento terapêutico de diversas neoplasias hematológicas. Além disso, possibilita a quantificação das subpopulações linfocitárias (SPL) para assistência diagnóstica e monitoramento das imunodeficiências primárias e adquiridas por meio das expressões antigênicas de CD19 e CD20 para linfócitos B; CD2, CD3, CD4 e CD8 para linfócitos T; e CD56 e CD16 para identificação de células natural killer (NK). A técnica de CF revolucionou a maneira como as células são identificadas e, ao longo dos anos, essa plataforma tem progredido com diversos avanços em hardware e software que visam melhorar o fluxo de trabalho, resultando em maior produtividade, qualidade e redução de custos. O Aquios CL – Beckman Coulter (BC) é um exemplo desse avanço, pois é um equipamento de automação completa em CF (denominado Load & Go flow cytometer) para quantificação de SPL na rotina diagnóstica. Neste estudo, o Aquios CL foi validado, e a quantificação em números relativos e absolutos das subpopulações linfocitárias teve uma excelente correlação com os resultados obtidos pela quantificação em plataforma dupla realizada no Cytomics FC500 (BC) e no analisador automatizado de células Sysmex XE-2100.

Unitermos: Aquios CL; citometria de fluxo; subpopulação linfocitária; CD4/CD8.

ABSTRACT

Flow cytometry (FC) is an essential tool for diagnosis, prognosis and therapeutic follow-up of several hematologic malignancies. In addition, it performs the quantification of lymphocytes subpopulations for diagnosis and monitoring of primary and acquired immunodeficiencies through the antigenic expressions of CD19 and CD20 for B lymphocytes; CD2, CD3, CD4, CD8 for T lymphocytes; and CD56 and CD16 for the identification of natural killer (NK) cells. The cytometry technique has revolutionized the way that the cells are identified, and over the years this platform has progressed with several advances in hardware and software that aim to improve workflow resulting in higher productivity, quality and cost savings. The Aquios CL – Beckman Coulter (BC) is an example of this advance because it is a complete automation instrument in flow cytometry called “Load & Go flow cytometer” for quantification of lymphocyte subpopulations in the routine diagnosis. In this study, the Aquios CL was validated, and quantification in frequency and absolute numbers of the lymphocyte subpopulations had an excellent correlation with the results obtained by the dual platform quantification performed in the Cytomics FC500 (BC) and automated Sysmex XE-2100 cell analyzer.

Key words: Aquios CL; flow cytometry; subpopulation of lymphocytes; CD4/CD8.

RESUMEN

La citometría de flujo (CF) es una herramienta importante para diagnóstico, pronóstico y seguimiento terapéutico de diversas neoplasias hematológicas. Además, posibilita la cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias (SPL) para asistencia diagnóstica y monitoreo de las inmunodeficiencias primarias y adquiridas a través de las expresiones antigénicas de CD19 y CD20 para linfocitos B; CD2, CD3, CD4 y CD8 para linfocitos T; y CD56 y CD16 para identificación de células natural killer (NK). La CF ha revolucionado la manera como las células son identificadas y, a lo largo de los años, esa plataforma ha progresado con diversos avances en hardware y software que aspiran a mejorar el flujo de trabajo resultando en mayor productividad, calidad y reducción de costos. El Aquios CL Beckman Coulter (BC) es un ejemplo de ese avance, pues es un instrumento de automatización completa en CF (llamado Load & Go flow cytometer) para cuantificación de SPL en la rutina diagnóstica. En este estudio el Aquios CL fue validado, y la cuantificación en números relativos y absolutos de las subpoblaciones linfocitarias tuvo una excelente correlación con los resultados obtenidos por la cuantificación en plataforma dupla realizada en el Cytomics FC500 (BC) y en el analizador automatizado de células Sysmex XE-2100.

Palabras clave: Aquios CL; citometría de flujo; subpoblación linfocitaria; CD4/CD8.

INTRODUÇÃO

A citometria de fluxo (CF) é uma ferramenta essencial para o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento terapêutico de diversas neoplasias hematológicas, bem como para as imunodeficiências primárias ou adquiridas⁽¹⁻³⁾.

A imunofenotipagem por CF quantifica as populações e subpopulações linfocitárias (SPL), avaliando, basicamente, as expressões antigênicas de CD19 e CD20 para linfócitos B; CD2, CD3, CD4 e CD8 para linfócitos T; e CD56 e CD16 para identificação de células *natural killer* (NK)^(2,4). A quantificação dessas populações auxilia o monitoramento de terapias imunossupressoras e imunomodulatórias e o diagnóstico e monitoramento de imunodeficiências primárias, além de contribuir para a avaliação de populações linfocitárias pós-transplante⁽⁴⁻⁶⁾. Além disso, a quantificação de linfócitos T CD4 no sangue periférico de pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (Aids) é importante para avaliar a progressão e a resposta da doença ao tratamento⁽⁷⁻⁹⁾.

O aumento do número de indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) proporcionou um avanço considerável da CF. A busca por serviços equipados com a tecnologia de quantificação de linfócitos T CD4 tornou-se cada vez mais frequente, e a utilização de ferramentas que agregam rapidez, eficiência e qualidade ao diagnóstico e ao monitoramento de imunodeficiências tem sido fundamental na prática clínica^(8,10).

A técnica de CF revolucionou a maneira como as células são caracterizadas e identificadas e, ao longo dos anos, essa plataforma progrediu com diversos avanços em *hardware* e *software* que visam

melhorar o fluxo de trabalho, resultando em maior produtividade, qualidade e redução de custos. Porém, a CF ainda é uma técnica laboriosa que envolve várias etapas técnicas de lavagem, marcação, aquisição e análise das amostras, o que aumenta significativamente as chances de erro durante o processo⁽¹¹⁾.

O equipamento Aquios CL – Beckman Coulter (BC) é uma ferramenta de automação completa em CF. É denominado *Load & Go flow cytometer* para quantificação de subpopulações linfocitárias na rotina diagnóstica, representando um avanço real e significativo na área de diagnóstico laboratorial^(11,12). Este trabalho teve como objetivos validar e comparar a quantificação em frequência e números absolutos das subpopulações linfocitárias realizadas no Aquios CL com os resultados obtidos pela plataforma dupla realizada no Cytomics FC500 (BC) e no analisador automatizado de células Sysmex XE2100 (Sysmex). Ademais, discutiremos os reais benefícios da utilização desse equipamento na rotina diagnóstica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Setenta e duas amostras de sangue periférico foram analisadas. A quantificação de linfócitos T CD3, CD4 e CD8 foi realizada em todas as amostras; e a quantificação de linfócitos B CD19+ e células NK CD16+CD56+, em 28 das 72 amostras. Estas foram coletadas em um tubo que continha o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e processadas em até 24 h após a coleta. Os pacientes apresentaram mediana de idade de 47 anos (faixa etária entre 1 e 99 anos); 37 eram do sexo masculino.

Cytomics FC500 e Sysmex XE2100

A contagem de leucócitos foi realizada no contador automatizado de células Sysmex XE2100 pela técnica de impedância e leitura óptica. O diferencial de leucócitos foi liberado automaticamente pelo equipamento e, quando necessário, um esfregaço sanguíneo era confeccionado para avaliação microscópica e quantificação acurada dos linfócitos totais.

Para a caracterização e a quantificação de subpopulações linfocitárias T CD3, CD4 e CD8, as amostras foram marcadas em um único tubo com os anticorpos monoclonais descritos na **Tabela 1**. Para identificar a população de células NK e linfócitos B, utilizamos três tubos de marcação com os monoclonais descritos nas **Tabelas 1 e 2**. Após marcação e incubação de 20 minutos, a *lise* de células vermelhas e a fixação dos leucócitos foram realizadas pelo sistema automatizado *no-wash* Coulter TQ-PREP (Beckman Coulter, SN: AV26068). Em seguida, as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo Cytomics FC500, e a análise dos dados foi realizada no *software* CXP Cytometer 2.2 e no Kaluza (Beckman Coulter).

Aquios CL

O Aquios CL é citômetro de fluxo, um sistema de plataforma única e contador automatizado de células que tem a vantagem de utilizar a impedância para a quantificação absoluta de leucócitos, e não a estratégia convencional da CF por meio de partículas fluorescentes (*beads*) de concentração conhecida.

Para avaliação e quantificação das subpopulações linfocitárias T CD3, CD3/CD4 e CD3/CD8, foi utilizado o *mix* de anticorpos monoclonais descrito na **Tabela 3**, disponível no

formato *ready-to-use*, denominado Tetra Panel 1. Na análise das populações de linfócitos B e células NK, o sistema utiliza o *mix* de anticorpos monoclonais Tetra Panel 2, descrito na **Tabela 4**. A utilização do Tetra Panel 1 e 2 para quantificação completa das subpopulações linfocitárias T, B e NK é denominada de Aquios Tetra Combo.

No Aquios CL, a marcação das amostras foi realizada em microplaca de 96 poços de maneira automatizada; a *lise* de células vermelhas, por meio da técnica *no-wash*. A análise dos dados foi realizada pelo próprio equipamento usando a estratégia automática de *gate*. Entretanto, o *software* permite que o usuário faça ajustes finos nos *gates*, quando necessário.

Análise estatística

Os resultados para cada método foram descritos com o uso de média e desvio padrão (DP), e a concordância entre os métodos para cada parâmetro foi verificada com o uso do coeficiente de correlação intraclass (CCI) e dos intervalos de confiança (IC) com 95%. A diferença entre os métodos foi estimada calculando-se a repetibilidade para cada parâmetro. Realizou-se a análise estatística com o *software* SPSS, versão 22.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

RESULTADOS

A comparação entre as diferentes plataformas de quantificação linfocitária levou em consideração os resultados em frequência e números absolutos e a interpretação final dos testes.

TABELA 1 – Anticorpos monoclonais utilizados para a identificação de subpopulações linfocitárias T CD3/CD4/CD8 e B no Cytomics FC500

Fluorocromos	Marcadores		Clone		Fabricante
	Subpopulação linfocitária T CD3/CD4/CD8	Subpopulação linfocitária B	Subpopulação linfocitária T CD3/CD4/CD8	Subpopulação linfocitária B	
FITC	CD8	CD19	SFCI21Thy2D3	89B	Beckman Coulter
PE	CD4	CD2	SFCI12T4D11	SFCI3P12H9	Beckman Coulter
ECD	CD45	CD45	J33	J33	Beckman Coulter
PC5	CD3	CD3	UCHT1	UCHT1	Beckman Coulter

FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; ECD: ficoeritrina texas red x.

TABELA 2 – Anticorpos monoclonais utilizados para a identificação de subpopulações linfocitárias NK no Cytomics FC500

Fluorocromos	Marcadores	Clone	Fabricante
FITC	CD3	UCHT1	Beckman Coulter
PE	CD56/16	N901/3G8	Beckman Coulter
ECD	CD45	J33	Beckman Coulter
PC5	CD2	39C1.5	Beckman Coulter

FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; ECD: ficoeritrina texas red x.

TABELA 3 – *Cocktail* de anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização de subpopulações de linfócitos T no Aquios CL

Fluorocromos	Tetra 1 – Panel	Clone	Fabricante
FITC	CD45	B3821F4A	Beckman Coulter
RD1	CD4	SFCI12T4D11	Beckman Coulter
ECD	CD8	SFCI21Thy2D3	Beckman Coulter
PC5	CD3	UCHT1	Beckman Coulter

FITC: isotiocianato de fluoresceína; ECD: ficoeritrina texas red x.

TABELA 4 – *Cocktail* de anticorpos monoclonais utilizado para a caracterização de subpopulações de linfócitos B e NK no Aquios CL

Fluorocromos	Tetra 2 – Panel	Clone	Fabricante
FITC	CD45	B3821F4A	Beckman Coulter
RD1	CD16/CD56	N901/NKH-1, 3G8	Beckman Coulter
ECD	CD19	J3-119	Beckman Coulter
PC5	CD3	UCHT1	Beckman Coulter

FITC: isotiocianato de fluoresceína; ECD: ficoeritrina texas red x.

A análise das 72 amostras demonstrou correlação estatisticamente aceitável entre os painéis utilizados no Aquios CL e o painel utilizado no Cytomics FC500. Para a identificação percentual da população de linfócitos T CD3, CD4 e CD8, o CCI foi de 0,989, 0,959 e 0,977, respectivamente. O parâmetro da relação CD4/CD8 apresentou correlação aceitável de 0,740, e a interpretação dos resultados foi a mesma em ambas as plataformas.

Na análise percentual da população de linfócitos B, o CCI foi de 0,997, enquanto para as células NK, a correlação obtida foi de 0,98 (Tabela 5).

As estratégias de *gates* utilizadas para identificar e quantificar a frequência dos linfócitos T, B e NK para o Aquios CL estão representadas nas Figuras 1 e 2; para o Cytomics FC500/software Kaluza, na Figura 3.

TABELA 5 – CCI obtido na comparação do FC500 com o Aquios CL

Variável	FC500			Aquios			CCI	IC (95%)		Repetibilidade
	Média	DP	n	Média	DP	n		Inferior	Superior	
CD3 %	72,7	16,8	72	72,1	15,9	72	0,989	0,982	0,993	1,7
CD3/mm ³	1.661,1	1.249,3	72	1.397,6	948,7	72	0,883	0,751	0,938	337,7
CD4 %	41,7	14,8	72	41,1	14,5	72	0,959	0,936	0,974	3
CD4/mm ³	945,3	962,6	72	799,1	728,1	72	0,91	0,836	0,948	237,5
CD8 %	27,4	13,7	72	28,7	13,1	72	0,977	0,95	0,988	1,8
CD8/mm ³	587,5	451,8	72	552	375,8	72	0,874	0,809	0,918	146,5
CD19 %	18,5	21,1	28	19,2	20,5	28	0,997	0,992	0,999	1,1
CD19/mm ³	698,04	1.537	28	638,07	1401,9	28	0,99	0,978	0,995	144,1
CelNK %	8,3	8,3	28	9,7	8,1	28	0,98	0,616	0,995	0,7
CelNK/mm ³	198,6	134,3	28	213,4	122,6	28	0,865	0,732	0,935	47
Relação CD4/CD8	2	1,5	72	1,8	1	72	0,74	0,603	0,832	0,6

CCI: coeficiente de correlação intraclass; DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança.

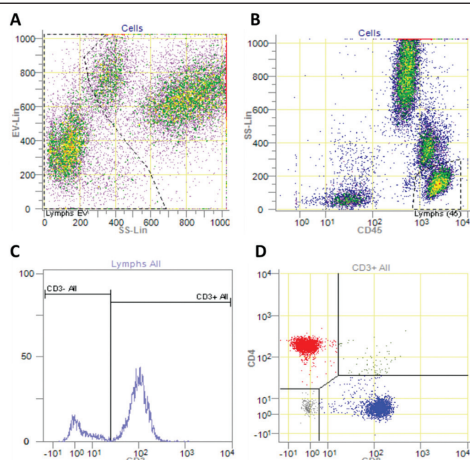


FIGURA 1 – Estratégia de gate utilizada no Aquios CL com o Tetra Panel 1

A população de linfócitos é selecionada por meio dos gates EV-Lin × Side Scatter (A) e SS-Lin × CD45 (B). Essa população é combinada em um gate denominado Lymphs All (C), e dentro da população CD3+, podemos identificar os linfócitos T CD4 e CD8 (D).

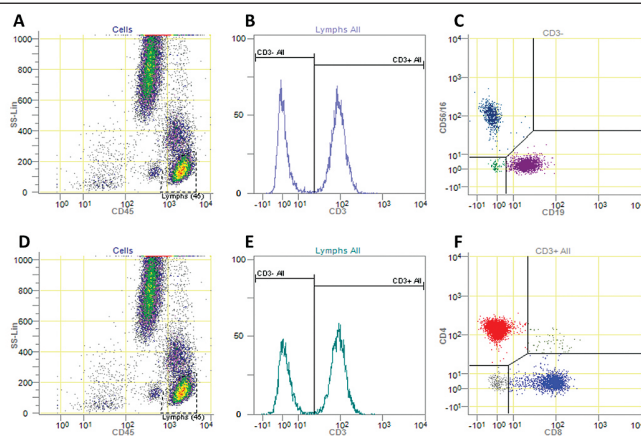


FIGURA 2 – Estratégia de gate utilizada no Aquios CL com o Tetra Panel 2

A e D) a população de linfócitos é selecionada por meio do SS-Lin × CD45; B e E) essa população é combinada em um gate denominado Lymphs All; C) dentro da população CD3+, podemos identificar os linfócitos T CD4 e CD8; F) dentro da população CD3, podemos identificar os linfócitos NK CD56+/CD16+ e os linfócitos B CD19+.

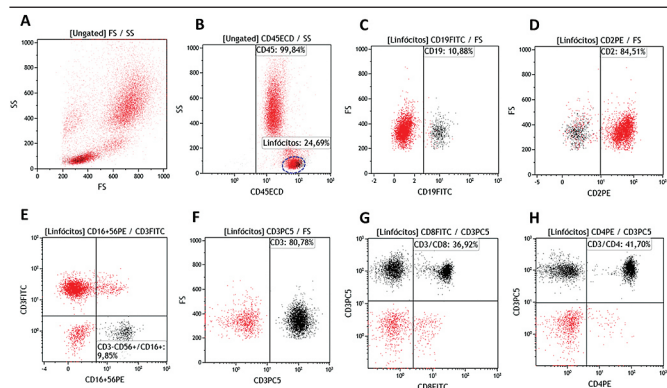


FIGURA 3 – Estratégia de gate utilizada no citômetro FC500 e software de análise Kaluza

A) seleção da população viável por meio de Side Scatter × Forward Scatter; B) Side Scatter × CD45 com gate na região de linfócitos totais; C, D e E) dentro do gate linfócitos, identificamos as populações de linfócitos T, B e NK; F, G e H) ainda dentro do gate linfócitos, identificamos a população de linfócitos T CD3 e as subpopulações CD4 e CD8.

DISCUSSÃO

A melhoria no fluxo de trabalho da CF é uma necessidade real nos laboratórios clínicos que buscam melhorar a produtividade, a qualidade e a redução dos custos. O equipamento Aquios CL atende essa demanda, pois proporciona melhorias na padronização técnica; reduz os erros pré-analíticos; evita troca de amostras, uma vez que todas as pipetagens são automatizadas e os reagentes/as amostras são monitorados por códigos de barra; aperfeiçoa o treinamento de funcionários; elimina a subjetividade da análise; monitora o controle de qualidade; e reduz o tempo de liberação dos resultados. Além disso, por ser um sistema fechado, o equipamento fornece ao operador uma manipulação segura da amostra, evitando contaminação biológica.

Nossos resultados demonstram significância estatística ao comparar a quantificação das subpopulações linfocitárias entre Aquios CL e Cytomics FC500, o que corrobora dados já publicados. Gossez *et al.* (2011)⁽¹¹⁾ evidenciaram que o Aquios CL obteve boa correlação na quantificação de linfócitos T CD4 quando comparado com o FC500. Ademais, ele pode ser utilizado na rotina diagnóstica e também em testes de proficiência.

Grossi *et al.* (2018)⁽¹²⁾ demonstraram boa correlação entre o Aquios CL em comparação com o *bead-based assay* do equipamento BD FACSCanto II. Esse estudo também demonstra

uma importante diminuição do tempo de atendimento total (TAT) por se tratar de um equipamento automatizado.

Em um trabalho publicado recentemente por Degandt *et al.* (2018)⁽⁴⁾, o desempenho do Aquios CL em relação à plataforma dupla Sysmex XE-5000 e BD FACSCanto II foi aceitável, entretanto, cerca de um terço das amostras necessitaram de ajuste manual no *gate* de linfócitos. Uma vantagem do *software* do Aquios CL é o sistema de *flags*, que sinaliza a necessidade de revisão de *gate*.

O sistema *Load & Go flow cytometer* do Aquios proporciona a preparação da amostra em conjunto com análise de fluorescência; gera resultados de frequência e números absolutos em um único equipamento (plataforma única); e tem a possibilidade de interface dos resultados com os sistemas informatizados dos laboratórios clínicos^(10,11).

A avaliação do custo não fez parte do escopo do nosso estudo, mas sabidamente os reagentes dos Aquios CL são mais caros do que aqueles utilizados na CF convencional. Entretanto, se levamos em consideração todos os benefícios técnicos já descritos para o Aquios, principalmente a redução significativa da mão de obra técnica devido à automação completa, é possível garantir que esse equipamento gere viabilidade econômica importante para laboratórios clínicos com grande volume de amostras.

A automação em CF acrescenta novas perspectivas para a técnica e proporciona melhoria na qualidade e na produtividade do processo, eliminando as chances de erro quase completamente.

Pela automação do processo de quantificação das células CD4, é possível não depender da formação e *expertise* de pessoal técnico, tornando o processo mais simplificado e independente de mão de obra especializada em sua realização, mas a interpretação e os níveis de revisão continuam sendo fundamentais no processo pós-analítico para o disparo do alerta na área clínica.

CONCLUSÃO

O equipamento Aquios CL apresentou excelente desempenho na quantificação de subpopulação linfocitária. Por se tratar de um equipamento com automação completa, promoveu padronização, qualidade e redução no tempo do procedimento técnico, tornando-se uma ferramenta adequada e viável em laboratórios clínicos com alto fluxo amostral.

REFERÊNCIAS

1. Sales MM, Vasconcelos DM. *Citometria de fluxo. Aplicações no laboratório clínico e de pesquisa*. São Paulo: Editora Atheneu; 2013. ISBN 978-85-388-0422-2.
2. Illoh OC. Current applications of flow cytometry in the diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Arch Pathol Lab Med*. 2004; 128: 23-31.
3. O'Gorman MRG. Role of flow cytometry in the diagnosis and monitoring of primary immunodeficiency disease. *Clin Lab Med*. 2007; 27: 591-626.
4. Degandt S, Peeters B, Jughmans S, Boeckx N, Bossuyt X. Analytical performance of an automated volumetric flow cytometer for quantitation of T, B and natural killer lymphocytes. *Clin Chem Lab Med*. 2018; 56(8): 1277-88.
5. Fleisher TA, Madkaikar M, Rosenzweig SD. Application of flow cytometry in the evaluation of primary immunodeficiencies. *Indian J Pediatr*. 2016; 83(5): 444-9.
6. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol* 2015; 35: 696-726.
7. Peeling RW, Sollis KA, Glover S, et al. CD4 enumeration technologies: a systematic review of test performance for determining eligibility for antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0115019.
8. Dieye TN, Vereecken C, Diallo AA, et al. Absolute CD4 T-cell counting in resource-poor settings: direct volumetric measurements versus bead-based clinical flow cytometry instruments. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005; 39(1): 32-7.
9. WHO. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach. 2 ed; 2016.
10. Mandy FF, Nicholson JK, McDougal JS; CDC. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*. 2003; 52(RR-2): 1-13.
11. Gossez M, Malcus C, Demaret J, Frater J, Poitevin-Later F, Monneret G. Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation. *Cytometry B Clin Cytom*. 2017; 92(6): 456-64.
12. Grossi V, Infantino M, Meacci F, et al. Comparison of methods and TAT assessment: volumetric AQUIOS CL and bead-based FACS CANTO II cytometers. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018; 94(4): 674-8.

AUTOR CORRESPONDENTE

Laiz Cameirão Bento  0000-0003-2258-4150
e-mail: laiz.bento@einstein.br



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.