

¿Y si resolviéramos la hematología compleja en el mismo instrumento que realizamos la hematología de rutina?

Bioq. Fabián Alberto Cusinato
Especialista de Producto
Abbott Laboratorios Argentina
División Diagnósticos
fabian.cusinato@abbott.com

Siempre es interesante iniciar una revisión de la evolución del instrumental de laboratorio recordando cómo era la Bioquímica antes de su aparición. Y no hace tanto tiempo atrás demorábamos 5 minutos en obtener sólo el resultado de un hematocrito. Ni hablar de un recuento de plaquetas realizado en cámara. Con la aparición de los primeros contadores, el trabajo comenzó a simplificarse aunque el proceso de un hemograma incluía al menos dos diluciones de la muestra que se procesaban en distintas posiciones del aparato.

Pero ¿qué podemos esperar hoy de un contador hematológico?

Les propongo concentrarnos en el Cell-Dyn Sapphire™.



Figura 1. El Cell-Dyn Sapphire™

Podríamos definir al Cell-Dyn Sapphire™ como lo hace el manual del usuario: Un analizador hematológico automático y multiparamétrico, diseñado para el hemograma y su utilización en el diagnóstico in vitro.

En otras palabras, este instrumento de mesada, nos informa todos los parámetros incluidos en el hemograma utilizando diferentes tecnologías: Citometría de flujo, fluorescencia, impedancia y espectrofotometría. La muestra es agitada a través de su mezclador por inversión y aspirada por una única punta de toma muestra. El instrumento reporta 28 parámetros básicos pudiendo llegar a obtener 35 parámetros de cada muestra (sin incluir la información para uso exclusivo del laboratorio). En el proceso básico, reporta el estudio de los leucocitos en valores absolutos y porcentuales para las poblaciones normales de la serie blanca. Además, genera alertas ante la

presencia de elementos inmaduros, cayados o elementos patológicos como pueden ser, por ejemplo: blastos. Todo esto a través de la tecnología MAPSSTM (Multi Angle Polarizad Scattergram Separation).

Utiliza impedancia y citometría de flujo para el recuento de glóbulos rojos y plaquetas obteniendo para estos parámetros un doble resultado que nos permite tener una absoluta confianza en el informe que estamos entregándole al paciente.

La detección y cuantificación de eritroblastos se ha convertido en un tema importante en el hemograma automatizado. Una característica sobresaliente del instrumento, es la capacidad de contar por fluorescencia los glóbulos rojos nucleados eliminando la necesidad de corrección del recuento de blancos en aquellas muestras que presenten dichos elementos.

Dentro de los métodos que utilizan fluorescencia, el ideal sería aquel económicamente viable que simultáneamente permita el análisis de leucocitos y glóbulos rojos nucleados dentro del hemograma de rutina. El método aplicado en el Cell-Dyn Sapphire™, utiliza el haz de láser de estado sólido de 488 nm. Se basa en la utilización de reactivos que causan la lisis de los glóbulos rojos causando cambios mínimos en los glóbulos blancos. Las células son expuestas simultáneamente a la acción del colorante Yoduro de Propidio (PI) que tiene la propiedad de diferenciar la permeabilidad de membrana de los glóbulos blancos. El PI tiñe los ácidos nucleicos de los núcleos expuestos de los glóbulos rojos nucleados. Los leucocitos viables se mantienen sin teñir. Los blancos no viables, son teñidos y resueltos por un algoritmo del software.

La absorbancia/emisión máximas para el PI son 482 nm y 636 nm respectivamente. La fluorescencia es detectada utilizando un filtro rojo (FL3). El instrumento analiza datos de 20.000 eventos celulares generando como resultado un valor proporcional de glóbulos rojos nucleados/100 glóbulos blancos y un recuento absoluto de eritroblastos.

El método no requiere activar un modo reflejo, o sea que está incluido en el hemograma de rutina.

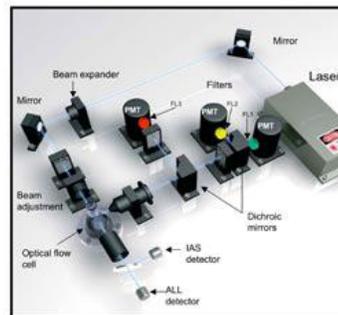


Figura 2. El banco óptico del CELL-DYN Sapphire™ incluyendo el Láser azul (488 nm) de estado sólido.

Cuando se lo solicita, el instrumento nos informa, en la misma pasada y con el mismo volumen de muestra (117 ul), el recuento absoluto de reticulocitos, su porcentual y la fracción de reticulocitos inmaduros. La detección se realiza con un reactivo específico fluorescente.

Resumiendo, con la misma tecnología, el Cell-Dyn Sapphire™ tiene la capacidad de contar reticulocitos, glóbulos rojos nucleados y de detectar si la muestra está en condiciones o si sus elementos están envejecidos.

¿Qué le estaría faltando a un instrumento de estas características para ser “el ideal” para nuestro laboratorio?

A excepción de ciertas alertas cualitativas que son sólo informativas, los contadores hematológicos proveen poca información importante acerca de las subpoblaciones de linfocitos o del linaje de los elementos inmaduros.

El análisis inmunológico de las subpoblaciones de linfocitos T es una de las técnicas de citometría de flujo más comunes en el laboratorio. Tiene un alto valor en leucemias y linfomas, pero su uso más común, es el de monitoreo del paciente con HIV.

El Cell-Dyn Sapphire™ tiene la posibilidad de realizar un test rápido (menor a 8 minutos) para el análisis de CD3/4/8.

El método utiliza anticuerpos liofilizados distribuidos en dos tubos. El primer tubo contiene anti-CD3 marcado con FITC y CD4 marcado con PE. Un segundo tubo contiene nuevamente un anticuerpo marcado para CD3 con FITC en combinación con un anticuerpo marcado con PE para CD8.

Los analizadores Cell-Dyn Sapphire™ utilizan una óptica integrada a mediciones fluorescentes (488nm) con fotolectores FL1 (FITC) y FL2 (PE) configurados para el análisis de fluorescencia.

Después de la incubación, tinción y lisis, el contenido de ambos tubos es analizado para 7° y 90° junto a las lecturas de FL1, FL2 y FL3. Los resultados se presentan como células T helper y T supresoras en porcentaje y absoluto, como así también el cociente Helper/Supresoras.



Figura 3. Para el análisis de subpoblaciones linfocitarias CD3/4/8, dos tubos conteniendo los anticuerpos monoclonales son colocados junto a la muestra de sangre entera del paciente. Todos los pasos e incubaciones son realizados automáticamente.

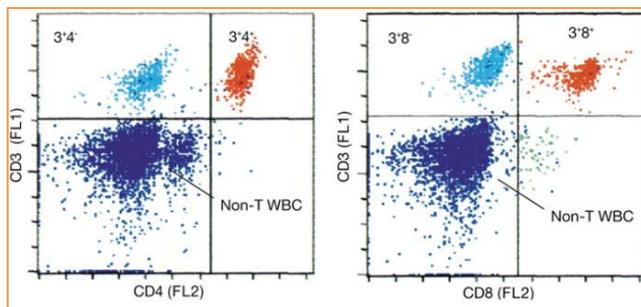


Figura 4. Scattergramas resultantes del análisis de subpoblaciones de linfocitos T. El primero muestra la tinción CD3/4 y los CD3+ CD4+ células helpers están marcadas en naranja en el cuadrante superior derecho. De igual modo, el gráfico CD3/8 muestra la población aislada de células T supresoras.

¿Qué otra aplicación podemos obtener del Cell-Dyn Sapphire™?

Un recuento de plaquetas confiable es crítico en aquellos valores cercanos al criterio de decisión médica, teniendo en cuenta los riesgos que implica una conducta médica incorrecta a la hora de indicar una transfusión. Como ya les mencionara anteriormente, el instrumento tiene la capacidad de realizar el recuento de plaquetas mediante dos tecnologías: impedancia y citometría de flujo.

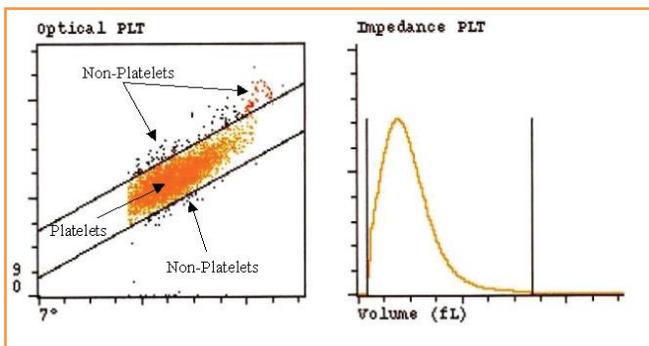


Figure 5. El Cell-Dyn Sapphire™ realiza simultáneamente el análisis óptico bidimensional y el recuento por impedancia de plaquetas. El método óptico es más efectivo en la localización y exclusión de artefactos no plaquetarios.

El impacto de las interferencias por elementos no plaquetarios (fragmentos de glóbulos rojos, fragmentos citoplasmáticos de leucocitos, etc.) se vuelve proporcionalmente más alto a medida que el recuento de plaquetas es más bajo.

Un método inmunológico diseñado para la exclusión de estos interferentes es el recuento por CD61.

Para correr el ensayo, sólo es necesario colocar un tubo CD61 en el lugar contiguo al tubo de hemograma en la

gradilla. Este tubo contiene el anticuerpo monoclonal anti CD61 conjugado con FITC liofilizado. Sin otra operación que la indicación por software de la realización del análisis, el instrumento dispensa la muestra en el tubo con CD 61, la mezcla y la incuba previo a pasarla por la celda de flujo de óptica y fluorescencia.

De esta manera, sólo son consideradas plaquetas, aquellas con fluorescencia positiva. Todo este proceso se realiza en forma totalmente automática en menos de 4 minutos.

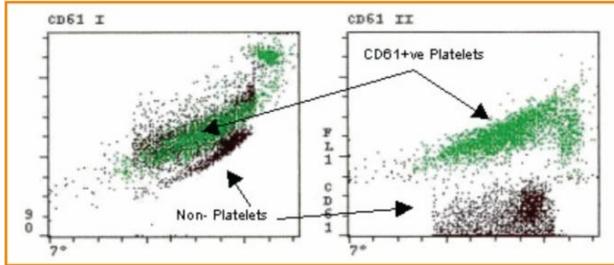


Figura 6. Scattergramas del análisis CD61 inmunoplaquetas. Los puntos verdes son identificados fehacientemente como plaquetas debido a su tinción fluorescente. Los eventos no plaquetarios (en este caso fragmentos de eritrocitos) aparecen como puntos negros. Las plaquetas verdaderas y las que no lo son, pueden graficarse sobre el gráfico bidimensional de plaquetas ópticas. (7° vs 90°).

Y a esta altura nos queda una sola pregunta: ¿No puedo realizar otras inmuno-marcaciones? La respuesta es sí.

La nueva versión del instrumento permite trabajar con aplicaciones para monoclonales “abiertos”.

Tradicionalmente, la citometría de flujo ha sido una disciplina realizada por especialistas. Hay una amplia variedad de posibilidades de uso de la inmunocitometría en la hematología. Utilizando el Cell-Dyn Sapphire™ en el modo CD3/4/8 se pueden obtener los datos de inmunofluorescencia de 3 colores junto con el manejo de datos automático, el manejo de la muestra también automático y su dispensado, incubación y lisis de glóbulos rojos. Esto representa una oportunidad única de realizar de manera rápida y mayormente automatizada otros ensayos de inmunocitometría.

Algunos de los ejemplos de ensayos posibles serían células B, células T y tipificación de células NK en pacientes con linfocitosis. O bien el estatus de los neutrófilos activados a través del CD 64. Y en el campo de las células rojas, es una excelente oportunidad de detectar presencia de células fetales en la circulación materna.

Si quisieran profundizar sobre esta aplicación, les recomiendo la lectura del trabajo Implementation of monoclonal antibody fluorescence on the Abbott CELL-DYN Sapphire haematology analyser: evaluation of lymphoid, myeloid and platelet markers de B. JOHANNESSEN et al , (Clin. Lab. Haem.2006, 28, 84–96) donde los autores realizan una evaluación del funcionamiento de los monoclonales abiertos en los que incluyen CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD13, CD14, CD16, CD19, CD22, CD33, CD34, CD41, CD42b, CD45, CD56, CD61, CD64, CD235a y HLA-DR concluyendo en que la capacidad

ampliada que se puede obtener con un analizador de rutina tiene el potencial de expandir las prácticas del laboratorio de hematología impactando positivamente en el laboratorio y su eficiencia clínica.

Conclusión: en un único instrumento Cell-Dyn Sapphire™ estamos obteniendo:

- Resultados del hemograma básico
- Recuento de glóbulos rojos nucleados por fluorescencia.
- Recuento de reticulocitos por fluorescencia en el mismo paso
- Sólo 5 reactivos.
- Análisis de CD3/4/8 totalmente automatizado.
- Análisis de plaquetas por dos métodos simultáneos (óptica e impedancia)
- Análisis de plaquetas por inmunocitometría CD61 totalmente automático
- Alta sensibilidad para la detección de agregados plaquetarios por su análisis óptico.
- Posibilidad de desarrollar otros ensayos por inmunocitometría en el laboratorio hematológico de rutina

"Estamos en un nuevo siglo. Estamos cambiando la visión en el diagnóstico de la hematología".

