

La citometria digital a la clínica

La citometria de flux (CMF) ens permet mesurar l'emissió de múltiples fluorescències i la dispersió de llum de cèl·lules o partícules microscòpiques, alineades de manera seqüencial a través d'un corrent líquid laminar, quan aquestes són presentades d'una en una i a una gran velocitat (fins a milers de cèl·lules / segon) front un feix de llum làser de longitud d'ona determinada. D'aquesta manera es discriminen partícules de diferent mida, complexitat i color utilitzant sondes fluorescents específiques d'un o més paràmetres cel·lulars per mesurar i quantificar propietats fenotípiques, bioquímiques i/o moleculars de cèl·lules individualitzades.

Des de la primera comercialització dels citòmetres a principis dels anys 70, la tecnologia de la CMF està en continua evolució i això condueix al desenvolupament d'assaigs cada vegada més sofisticats.

En els últims 10 anys, els avenços en instrumentació, el pas de la citometria analògica a la citometria digital, i la disponibilitat d'una ampla gama d'anticossos i fluorocroms, han millorat la nostra capacitat d'identificar poblacions cel·lulars normals i reconèixer poblacions atípiques o fenotípicament aberrants inclús quan aquestes, especialment detectables en els citòmetres digitals, són o representen una petita proporció de les cèl·lules analitzades. En aquest sentit es podria dir que l'ús clínic de la CMF s'ha anat refinant.

Actualment els citòmetres digitals tenen la capacitat de mesurar fins a 20 paràmetres en una sola mostra. Per aquesta raó, els protocols dissenyats per a la citometria digital multicolor necessiten ser desenvolupats amb molta cura per poder assegurar la fiabilitat de les dades generades.

Diferents aspectes, inclosos l'elecció del citòmetre i la selecció dels reactius (anticossos, clones i combinació de fluorocroms) han de ser considerats a l'hora de generar i optimitzar un panel complex d'estudi immunofenotípic sobretot quan es treballa a l'àrea assistencial i s'ha de donar un diagnòstic, ja que els resultats i la interpretació dels mateixos és laboriosa i cal que siguin reproduïbles entre diferents laboratoris, amb diversos nivells d'estandardització.

Aspectes tècnics

Amb els citòmetres analògics, realitzar una adquisició conjunta de diferents tubs per un mateix estudi implica assumir que al fitxer de dades queden enregistrades totes les fluctuacions que pateixen les fluorescències al canviar d'un tub a un altre. Quan s'inicia l'adquisició d'un tub, inevitablement es produeixen turbulències que afecten a l'estabilitat de la fluorescència, i que

Catlab Informa

influeixen significativament en els resultats. En un citòmetre analògic, quan s'atura l'adquisició de la mostra, es para definitivament la gravació de dades en el fitxer. Per aquest motiu, s'ha de canviar de tub sense parar l'adquisició i això comporta enregistrar totes les dades, inclús les generades durant les turbulències derivades del canvi de tub.

Els citòmetres digitals el que fan és digitalitzar la fluorescència emesa per la cèl·lula. Entre els diferents avantatges que això ens ofereix, un molt evident és que permeten realitzar adquisicions independents de tubs diferents, incorporant totes les dades al mateix fitxer. És a dir, l'adquisició s'atura entre tub i tub, i quan es torna a reiniciar les dades es segueixen guardant al mateix fitxer. Aquest fet permet excloure del fitxer les dades corresponents a les turbulències generades a l'inici de l'adquisició de cada tub, garantint la fiabilitat dels resultats.

Un altre avantatge dels citòmetres actuals a l'hora d'adquirir quantitats molt elevades de cèl·lules és la rapidesa que proporciona l'electrònica digital. Permet que el temps total d'adquisició es mantingui en un marc raonable per a la pràctica clínica.

A més d'aquests avantatges fonamentals, la citometria digital ofereix altres de vital importància, com és mesurar la quantitat total de fluorescència que emet la cèl·lula (paràmetre *àrea* "A"), en lloc de la intensitat màxima de fluorescència emesa que fan els analògics (paràmetre *alçada del pols elèctric* "H"). La fluorescència en els analògics es quantifica a una escala de 1024 unitats (anomenades *canals de fluorescència*), mentre que als digitals l'escala es divideix en 262144 canals. Això, augmenta la resolució dels equips digitals, especialment per a senyals dèbils de fluorescència. Es suma que els citòmetres actuals permeten analitzar de vuit a deu fluorescències simultàniament, a més de què compten amb òptiques de reflexió en lloc de transmissió augmentant l'eficiència del senyal.

Un dels avenços més significatius de la citometria digital a nivell d'usuari ha estat el fet de poder compensar els diferents senyals de fluorescència que emeten les cèl·lules marcades, corregint el anomenat "*spillover*" entre fluorocroms (a través d'una sèrie de càlculs matemàtics amb una matriu que genera el "software") un cop la mostra ja ha estat adquirida i guardada. D'aquesta manera es corregeixen els excessos, defectes i solapaments de fluorescència entre fluorocroms amb espectres d'emissió de senyal propers. S'eviten falsos positius i falsos negatius, sempre que els canvis es realitzin amb criteri, i la mostra es pot gravar reanalitzada i modificada.

Catlab Informa

Aplicacions clíniques

Tan la citometria clàssica com l'actual permeten caracteritzar cèl·lules normals i detectar i identificar cèl·lules atípiques. Aquests fets són útils en línies generals pel:

- Diagnòstic basat en l'anàlisi cel·lular
- Pronòstic basat en l'anàlisi cel·lular
- Avaluació i monitorització de tractament
- Anàlisi de la lesió i mort cel·lular

En concret, La citometria digital en quan al marcatge de la superfície cel·lular ens permet realitzar un estudi ràpid de les interaccions entre diferents poblacions cel·lulars en suspensió en una quantitat mínima de mostra, des de sang perifèrica, moll de l'os, líquid pleural, biòpsia de gangli, etc...i en un temps rècord sense l'exigència o requisit que altres tècniques necessiten com és l'aïllament cel·lular. Una altra aplicació és la tinció de citoquines intracel·lulars detectant simultàniament marcadors d'activació cel·lular tan a nivell intracel·lular com a nivell superficial. Com també és possible fer el seguiment d'esdeveniments intracel·lulars que permeten l'estudi de senyalització cel·lular i l'expressió de factors de transcripció, així com l'estudi del cicle cel·lular i la proliferació cel·lular.

Un dels camps on la CMF ha estat indispensable ha estat pel diagnòstic, la classificació, l'estadiatge i la monitorització de malalties oncohematològiques. Avui, l'increment de sensibilitat i especificitat de la citometria digital permeten per exemple, la quantificació de la malaltia mínima residual (MMR) en el maneigament de pacients amb neoplàsies hematològiques. El grau de MMR té un valor pronòstic i avalua l'efectivitat del tractament, proporcionant informació molt útil per a prendre decisions terapèutiques a temps real com són prolongar el tractament, modificar-lo, realitzar un trasplantament de progenitors hematopoiètics, etc... en malalties com el mieloma múltiple, la leucèmia limfàtica crònica, els limfomes i les leucèmies agudes.

La detecció de MMR per CMF digital es basa en la capacitat de diferenciar immunofenotípicament les cèl·lules neoplàsiques de les que no ho són. Per això és indispensable analitzar amb detall el patró antigènic tumoral i identificar els marcadors en els que es diferencia del seu equivalent normal. I és imprescindible que l'estudi immunofenotípic al diagnòstic sigui molt meticulós.

A Catlab, la incorporació recent del citòmetre digital BD FACSCanto II de Becton Dickinson amb 3 làsers ens permet analitzar fins a vuit colors en un sol tub. Amb el suport dels softwares BD FACSCanto i BD FACSDiva,, a més del Infinicyt, pretenem donar més i millor servei als clínics.

Catlab Informa

La garantia de qualitat i reproductibilitat dels nostres resultats està recolzada en el seguiment dels protocols del grup Euroflow.

Euroflow és un consorci científic format per dues empreses (PYMES) i vuit grups de recerca a nivell europeu, considerats internacionalment com a experts en CMF i diagnòstic molecular. L'objectiu d'aquest consorci no és altre que desenvolupar, estandarditzar i implementar protocols altament sensibles, precisos i ràpids de CMF amb la finalitat diagnòstica i la classificació pronòstica de malalties hematològiques així com l'avaluació de l'eficàcia del tractament durant el seguiment de la malaltia.

Bibliografia:

- 1- Autissier P. et al. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans; *Cytometry part A* 2010, Vol.77A(5), pp.410-419.
- 2- Béné MC, Kaeda JS. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European Leukemia Net. *Haematologica* 2009;94(8):1135-50.
- 3- De Tute RM, Jack AS, Child JA, Morgan GJ, Owen RG, Rawstron AC. A single-tub six-colour flow cytometry screening assay for the detection of minimal residual disease in myeloma. *Leukemia* 2007; 21(9):2046-49.
- 4- JJM van Dongen , L Lhermitte, S Böttcher, J Almeida, VHJ van der Velden, J Flores-Montero, A Rawstron, V Asnafi, Q Lécresse, P Lucio, E Mejstrikova, T Szczepanski, T Kalina, R de Tute, M Brüggemann, L Sedek, M Cullen, AW Langerak, A Mendonça, E Macintyre, M Martin-Ayuso, O Hrusak, MB Vidriales and A Orfao on behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012; 26, 1908–1975.
- 5- Kern W, Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; 23 (3):379-90.
- 6- Mahnke YD. & Roederer M. Optimizing a Multicolor Immunophenotyping Assay; *Clin Lab Med* 2007, Vol.27(3), pp.469-485.
- 7- Nick A., Zilmer, Mahesh Godavarti, Jeffrey J. Rodriguez, Timothy A. Yopp, Georgina M. Lambert, and David W. Galbraith. Flow Cytometric Analysis Using Digital Signal Processing. *Cytometry* 1995; 20:102-117.
- 8- Walter R, Gooley T, Wood B, Milano F, Fang M, Sorrow M, et al. Impact of pretransplantation minimal residual disease, as detected by multiparametric flow cytometry, on outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia. *J. Clin Oncol* 2011;29(9):1190-97.

Catlab Informa

9- Wood BL, Arroz M, Barnett D, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72B:S14-S22.

Dra. Judith Vidal

Responsable Citometria de flux

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 5041 / 616.26.48.91

jvidal@catlab.cat

www.catlab.cat
