CUANTIFICACION DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA POR CITOMETRIA DE FLUJO DETERMINACION DE INTERVALOS DE REFERENCIA EN POBLACION ADULTA SANA DE LA CIUDAD DE MEXICO

Daniel Razo Morales*
Jorge García Navarro*
Luis Llorente**

* Departamento de Hematología, CARPERMOR S.A. de C.V.

** Instituto Nacional de la Nutrición.

"Dr. Salvador Zubirán", Cd. de México D.F., MEXICO.

RESUMEN

Marco Teórico: La citometría de flujo con anticuerpos monoclonales es actualmente el método de elección para caracterizar las subpoblaciones de linfocitos, siendo fundamentalmente útil para el estudio diagnóstico y pronóstico de pacientes infectados con VIH.

Objetivo: Establecer valores de referencia de una población adulta de individuos sanos de la Ciudad de México.

Tipo de Estudio: Estudio prospectivo en 130 adultos sanos y ambulatorios, de ambos sexos (M=53%), con un rango de edad de 16 a 56 años ($x=27.2$ años). La cuenta de linfocitos en números absolutos se realizó en un analizador Technicon H-1. La citometría de flujo se llevó a cabo en un Coulter Epics XL analizando los marcadores CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD45, CD56.

Conclusiones: Consideramos que los valores de referencia obtenidos son representativos y estadísticamente significativos dado el tamaño de la muestra (>120), los datos no pueden ser extrapolados a poblaciones pediátricas ni geriátricas; del mismo modo tampoco pueden aplicarse a otras metodologías. Contar con valores de referencia propios incrementa la potencia diagnóstica del método lo cual tendrá relevancia clínica para el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades del sistema inmune.

Palabras clave: Linfocitos, Citometría de Flujo, SIDA, VIH.

SUMMARY

Background: Flow cytometry with monoclonal antibodies is the elective methodology to characterize lymphocyte subsets. This assay is particularly useful in HIV positive patients in order to establish AIDS diagnosis and prognosis.

Objective: To establish reference values in an ambulatory healthy sample of individuals living in Mexico City.

Type of study: Prospective in 130 individuals, males=53%, range of 16 to 56 years ($x=27.2$). Total lymphs in absolute number was determined in Technicon H-1. Flow Cytometry was done with Coulter Epics XL analyzing CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD45, CD56 cellular markers.

Conclusions: Our reference values are representative and statistically significant according to the size of the sample (>120). These data can not be used for pediatric or geriatric populations, and should not be extrapolated to other methodologies. Each Laboratory must determine proper reference values in order to improve the clinical relevance of diagnosis and prognosis of immunological diseases.

OBJETIVO

Cuantificar las distintas especies linfocitarias de sangre periférica, por citometría de flujo, en una población representativa, adulta y sana, de la ciudad de México, con el propósito de establecer valores de referencia, que puedan servir como parámetro de comparación a otros laboratorios clínicos que cuenten con la misma metodología.

ANTECEDENTES

La técnica de citometría de flujo para el análisis celular se ha desplazado rápidamente de la investigación básica al laboratorio clínico.¹ La combinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales con un sistema de detección óptica altamente sensible, aunado a la capacidad procesadora de las computadoras, ha brindado un impacto considerable a la moderna citometría de flujo en la medicina clínica. Esto ha sido particularmente importante en la fenotipificación de las subpoblaciones de linfocitos T durante la infección de VIH y en el SIDA.²⁻⁵ Los niveles de células T CD4⁺ constituyen un factor pronóstico importante en la infección por VIH y en la actualidad, son los marcadores más relevantes para el seguimiento de la enfermedad y para el inicio de la terapia antiretroviral y antibiótica para gérmenes oportunistas.^{6,7} Otras enfermedades como las leucemias e inmunodeficiencias combinadas o selectivas también presentan alteraciones fenotípicas de las subpoblaciones linfocitarias.⁸⁻¹² Más aún, la monitorización de las células CD3 positivas en sangre periférica en pacientes trasplantados da la pauta para el inicio de la terapia inmunosupresora con el anticuerpo monoclonal OKT3.¹³ Muchos médicos trasplantólogos observan cuidadosamente las subpoblaciones linfocitarias después de haber realizado un trasplante para distinguir entre rechazo del órgano, infección o efectos tóxicos de la ciclosporina.¹⁴ La inmunofenotipificación de linfocitos también ha sido útil para observar procesos que ocurren en enfermedades autoinmunes¹⁵ y en la inmunomodulación durante quimioterapia.¹⁶

Si bien en esta década la citometría de flujo es la metodología de elección para inmunotipificar subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica, no existe un consenso general para el control de calidad en esta área. Esto se debe a las diferentes técnicas empleadas para determinar los números absolutos y relativos de las diversas subpoblaciones, a las diferencias en el procesamiento de las muestras, de reactivos y métodos analíticos y al poco interés que han mostrado muchos laboratorios clínicos en no participar en los esfuerzos de control de calidad.¹⁷ Obviamente esto es crítico en pacientes infectados por VIH, en trasplantados y en inmunodeficiencias que son seguidos por inmunotipificaciones seriadas para monitorizar la progresión de la enfermedad y que, frecuentemente, éstas se llevan a cabo en distintos laboratorios. Para el paciente y el médico tratante, los resultados del laboratorio deben ser consistentes y fidedignos de tal suerte que tengan utilidad clínica y terapéutica. De hecho, ya es un concepto en los Estados Unidos de Norteamérica, los buenos datos cuantitativos, la consistencia de un mismo laboratorio y la comparabilidad entre distintos laboratorios en cuanto a tipificación por citometría de flujo se refiere.¹⁸⁻²²

MATERIAL Y METODOS

Población estudiada. Se estudiaron 130 adultos con edades entre 16 y 56 años (media 27.21 ± 6.68), 61 del sexo femenino y 69 del sexo masculino, residentes de la ciudad de

México. Todos eran individuos sanos sin historia de infección viral o toma de medicamentos por lo menos un mes antes del estudio.

Proceso de las muestras. Se obtuvieron 5 ml de sangre anticoagulada con ACD y 5 ml de sangre anticoagulada con EDTA de todos los sujetos estudiados. La flebotomía, en todos los casos se efectuó entre las 7:00 y las 11:00 horas. La cuenta de leucocitos se realizó del tubo con anticoagulante EDTA en un Technicon H-1, para obtener los valores absolutos y relativos de linfocitos para cada participante. Todas las muestras de sangre fueron procesadas entre las 10 primeras horas después de haberse obtenido. Para la inmunofenotipificación, todas las muestras se estudiaron mediante el sistema de lisis rápida de sangre total (Coulter Immunoprep, Epics Leucocyte Preparation System, Coulter Immunology).²³ Del tubo con anticoagulante ACD se tomaron 100 ul de sangre total a los que se agregaron 10 ul de cada uno de los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) o con Ficoeritrina (RD1) (Cytostat/Coulter Clone): anti-CD3, anti-CD2, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD56 (tabla 1), anti-CD45, anti-CD14 e IgG1-FITC/IgG1-RD1 (control de isotipo), i.e., ocho muestras en total por individuo estudiado (ver cuadro 1).

*Cuadro 1
Panel de anticuerpos monoclonales**

ANTIGENO DE DIFERENCIACION	ANTICUERPO MONOCLONAL	REACTIVIDAD
CD2	T11	Pan-células T, antígeno asociado a receptor de rosetas E
CD3	T3	Pan-células T, receptor de antígenos
CD4	T4	Linfocitos T cooperadores e inductores
CD8	T8	Linfocitos T supresores y citotóxicos
CD19	B4	Pan-células B
CD45	KC56	Pan-leucocitos
CD56	NKH-1	Células asesinas NK

*Coulter Immunology, Hialeah, Fla.

Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, las alícuotas teñidas fueron procesadas en el sistema de lisis de sangre total (Q-Prep, Coulter Immunology) mediante un ciclo de 35 segundos. Este sistema añade secuencialmente el reactivo A (ácido fórmico) para lisar eritrocitos, el reactivo B (Carbonato de sodio-cloruro de sodio-sulfato de sodio), para estabilizar a los leucocitos y el reactivo C (paraformaldehído), como fijador de membranas. Después de este paso, las muestras lisadas y fijadas estaban listas para su análisis por citometría de flujo.

Citometría de flujo. Todas las alícuotas de sangre fueron analizadas en un citómetro de flujo Epics XL (Epics Profile, Coulter Corp.). En forma simplificada, el citómetro de flujo se divide en tres compartimentos funcionales distintos: dinámica de flujos, óptica y cibernética.¹ El primero de ellos es responsable de crear un flujo axial de líquido isotónico que obliga a las células en estudio a pasar a gran velocidad, pero en forma secuencial y aislada, a través de una celda capilar. A su paso por ésta, las células son incididas por un rayo láser, que es dispersado en todas direcciones al chocar con ellas. La magnitud de la dispersión del láser en ángulos cercanos a 0° es directamente proporcional al tamaño de la célula y es medida y registrada por un fotodetector situado delante de la fuente luminosa. Por su parte, la magnitud en que se dispersa la luz en ángulos cercanos a 90°, es proporcional a la textura de la célula y es medida y registrada por un foto-multiplicador situado en posición ortogonal a la dirección del rayo láser. Con sólo esta información, un microprocesador asigna, para cada célula, un valor de tamaño y otro de textura que, posteriormente, puede emplearse en la elaboración de histogramas con estos dos parámetros. Si adicionalmente, las células han sido marcadas con fluorocromos a través de moléculas fluoresceinadas (e.g. anticuerpos), el mismo rayo láser excita a los fluorocromos, quienes emiten luz con longitudes de onda diferentes, que son detectadas, previa filtración

y reflexión, por fotomultiplicadores adicionales. Así, el microprocesador colecta además la información sobre la presencia e intensidad de fluorescencia en cada célula. Mediante mapas electrónicos es posible aislar a un grupo de células, e.g. los linfocitos, y obtener información sobre la presencia de fluorocromos únicamente en esa población celular. En este estudio se empleó el anticuerpo monoclonal anti-CD45 para descartar elementos que no fueran leucocitos, e.g. eritrocitos nucleados, partículas, y además se estableció un mapa electrónico para asegurar que un mínimo de 98% de las células analizadas fuesen linfocitos. Los controles de isotipo se incluyeron en cada muestra para corregir unión inespecífica y fluorescencia de fondo.

ANALISIS DE RESULTADOS

De los histogramas generados en el citómetro de flujo y de la cuenta absoluta de linfocitos, se calcularon los números absolutos y relativos de los linfocitos CD2, CD3 CD4, CD8, CD19 y CD56 así como la relación CD4/CD8. Todos los grupos de datos fueron evaluados por su tipo de distribución por la prueba de homogeneidad (goodness of fit test).²⁴ Este análisis inicial de datos demostró que varios grupos no presentaban una verdadera y bien delineada distribución gaussiana (datos no mostrados). Lo más común fue observar curvas sesgadas, por lo que se establecieron las percentilas para todas las subpoblaciones y la relación cooperadora-inductora/supresora-citotóxica (CD4/CD8). La mediana y los intervalos (percentilas 2.5 y 97.5) obtenidos de los 130 individuos tipificados se muestran resumidos en el cuadro 2.

33

*Cuadro 2
Valores obtenidos de subpoblaciones linfocitarias*

	INTERVALO	MEDIANA
Linfocitos, %	18-46	31
Linfocitos, N° absoluto x 106L	1260-3250	1976
T3 (CD3), %	53-83	71
T3 (CD3), N° absoluto x 106L	865-2465	1383
T11 (CD2), %	68-90	82
T11 (CD2), N° absoluto x 106L	1039-2685	1658
T4 (CD4), %	24-56	42
T4 (CD4), N° absoluto x 106L	457-1536	822
T8 (CD8), %	17-41	26
T8 (CD8), N° absoluto x 106L	280-1189	511
B4 (CD19), %	7-27	15
B4 (CD19), N° absoluto x 106L	121-735	275
NKH-1 (CD56), %	3-33	13
NKH-1 (CD56), N° absoluto x 106L	69-705	246
Relación CD4/CD8	0.8-2.7	1.6

DISCUSION

La inmunofenotipificación de leucocitos de sangre periférica se ha empleado para establecer el status inmunológico en una amplia gamma de enfermedades. No sólo la enfermedad por sí misma tiene influencia sobre el inmunofenotipo, sino que una gran variedad de factores biológicos y técnicos puede afectar los resultados. Los factores biológicos incluyen infecciones virales,²⁶ stress,^{27,28} medicamentos,^{29,30} tabaquismo³¹ y alteraciones endócrinas.³² Los técnicos incluyen, preparación de las muestras, instrumentación, procedimientos y reactivos empleados. Todos estos factores deben ser considerados en estudios de inmunofenotipificación tanto en los transversales, como el nuestro, como en los longitudinales.^{33,34} Nuestro estudio consideró únicamente individuos sanos sin infecciones virales ni tratamiento por lo menos un mes antes de la flebotomía, aunque no consideramos stress ni tabaquismo. Para minimizar los factores técnicos, todas

las muestras fueron procesadas en un lapso menor de 10 horas después de haber sido obtenidas; se empleó el mismo citómetro de flujo a través de todo el estudio así como el procesamiento y manipulación de las muestras; finalmente, todos los anticuerpos fueron de la casa Coulter para eliminar la variable tecnológica de producción de anticuerpos monoclonales. El único anticuerpo monoclonal que presentó gran sesgo en su curva de distribución fue el dirigido ante el antígeno CD56, i.e., las células asesinas o NK. Para este anticuerpo no hay valores de referencia publicados, no obstante, es práctica común reportarlo en los laboratorios clínicos. Es importante hacer notar que tres muestras fueron tipificadas con otro anticuerpo monoclonal anti-CD56 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) y se encontraron los mismos valores absolutos y porcentuales de positividad al compararlos con el anticuerpo NKH-1 de Coulter (datos no mostrados). Esta amplia dispersión en los valores de células NK podría deberse a la técnica de lisis rápida en sangre total. Otras técnicas,²³ más demoradas y menos prácticas, emplean lavados en varios pasos que logran eliminar factores séricos no identificados, podrían afectar la afinidad de los anticuerpos monoclonales anti-CD56. Sin embargo, esta amplitud en su distribución no parece tener relevancia clínica.³⁵ Así y todo, lo encontrado representa los valores de 130 individuos, lo cual es un número mayor al aceptado para definir y determinar valores de referencia en el laboratorio clínico.³⁶ Los valores de referencia que aquí reportamos contemplaron una población adulta sana. No estudiamos menores de edad. Esto será objeto de otro reporte. No obstante podemos anticipar que la técnica empleada en el presente trabajo será la de elección puesto que las muestras que se obtienen de sangre en ocasiones suele ser mínima. Así mismo, no se incluyó tipificación de ancianos.

CONCLUSIONES

Los valores encontrados en nuestro estudio son comparables a los reportados por otros autores,¹⁵⁻²³ con una discreta disminución en los valores inferiores de normalidad en algunas determinaciones, e.g. el número absoluto de células CD4, aunque esto se ha observado cuando se emplea la técnica rápida de lisis de sangre total.²³ Establecimos cuidadosamente los valores de referencia de las distintas estirpes linfocitarias por citometría de flujo (cuadro 2) en una población adulta y sana de la ciudad de México, por la técnica de lisis rápida de sangre periférica. Los resultados que presentamos podrán ser útiles como criterio de control de calidad para los laboratorios que cuenten con citómetro y proporcionarán al médico valores fidedignos, consistentes y de relevancia clínica para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades del sistema inmunológico.

REFERENCIAS

1. SHAPIRO HM. Practical flow cytometry. 2ª de. Alan R. Liss, Inc. New York, 1988
2. DETELS R, et al. Patterns of CD4+ cell changes after HIV-1 infection indicate the existence of a codeterminant of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1:1390, 1988
3. LANG W, et al. Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2:63, 1989.
4. STEIN DS, et al CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. *J Infect Dis* 165:352, 1992.
5. NICHOLSON JKA, et al. Phenotypic distribution of T cells of patients who have subsequently developed AIDS. *Clin Immunol Immunopathol* 43:82, 1987.
6. FICHL MA et al. The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection: a double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 112:727, 1990
7. CDC. Recommendations for Prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia for adults and adolescents infected with human immunodeficiency virus. *MMWR* 41:(Nº RR-4), 1992.
8. BROWMAN GP et al. The contribution of cytochemistry and immunophenotyping to the reproducibility of the FAB classification in acute leukemia. *Blood* 68:900, 1986.
9. CAMPOS L et al. Surface maker expression in adult acute myeloid leukemia: correlation with initial characteristics, morphology and response to therapy. *Br J Haematol* 73:323, 1989.
10. BALL ED et al. Prognostic value of lymphocyte surface makers in acute myeloid leukemia. *Blood* 77:2242, 1991.

11. LANIER L et al. Correlation of cell surface antigen expression on human thymocytes by multi-color flow cytometric analysis: implication for differentiation. *J Immunol* 137:2501, 1986.
12. LOKEN MR et al. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 70:1316, 1987.
13. BENVENISTY AI et al. Improved results using OKT3 as induction immunosuppression in renal allograft recipients with delayed graft function. *Transplantation* 49:321, 1990.
14. GOLDMAN M et al. Beneficial effects of prophylactic OKT3 in cadaver kidney transplantation: comparison with cyclosporin A in a single-center prospective randomised study. *Transplantation Proc* 23:1046, 1991.
15. GIORGI J. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. En: Rose N, Friedman H & Fahey J. eds *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington, D.C. American Society for Microbiology. 1986 pp 236-246.
16. THORNTHWAITE J et al. Characteristics of monoclonal antibody measurements in human peripheral blood. *Ann NY Acad Sci* 468:144, 1986.
17. FAHEY J. Doing it right: measuring T cell subsets by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopathol* 55:171, 1990.
18. GIORGI JV et al. Quality control in the flow cytometric measurements of T lymphocytes subsets: The multicenter AIDS cohort study experience. *Clin Immunol Immunopathol* 55:173, 1990.
19. PARKER JW, et al. Leucocyte immunophenotyping by flow cytometry in a multisite study: standarization, quality control, and normal values in the transfusion safety study. *Clin Immunol Immunopathol* 55:187, 1990.
20. KIDD PG et al. Report of the workshop on the evaluation of T-cell subsets during HIV infection and AIDS. *Clin Immunol Immunopathol* 52:3, 1989.
21. PAXTON H et al. Results of the flow cytometry ACTG quality control program: analysis and findings. *Clin Immunol Immunopathol* 52:68, 1989.
22. RICKMAN WJ et al. Department of army lymphocyte immunophenotyping quality assurance program. *Clin Immunol Immunopathol* 52:85, 1989.
23. KOTYLO PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets. A comparasion of standar vs rapid whole-blood lysis technique. *Arch Pathol Lab Med* 115:181, 1991.
24. ZAR J. *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliffs, NJ. Prentice Hall International Inc. New York, 1994.
25. GELMAN R et al. Biostatistical considerations for quality assesment of immunologic measurements used in clinical and longitudinal studies. *Clin Immunol Immunopathol* 52:28, 1989.
26. ROUSE B et al. Immunosuppression in viral infections. *Rev Infect Dis* 8:850, 1986.
27. LANDMAN RMA et al. Changes of immunoregulatory cells induced by psychological and physical stress: relationship to plasma catecolamines. *Clin Exp Immunol* 58:127, 1984.
28. SCHINDLER BA. Stress affective disorders and immune function. *Med Clin North Amer* 69:585, 1985.
29. GRISWOLD DE et al. Inhibition of T suppressor cell expression by histamine type 2 (H2) receptor antagonist. *J Immunol* 132:3054, 1984.
30. MEULEMAN J et al. The immunologic effects, kinetics, and use of glucocorticosteroids. *Med Clin North Amer* 69:805, 1985.
31. GINNS LC et al. T-lymphocytes subsets in smoking and lung cancer: analisys by monoclonal antibodies and flow cytometry. *Amer Rev Respir Dis* 126:265, 1982.
32. PAPIC M et al. Suppression of peripheral blood natural killer cel activity by excess thyroid hormone. *J Clin Invest* 79:404, 1987.
33. LANDAY AL et al. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopathol* 52:48, 1989.
34. KOEPKE JA et al. Precision and accuracy of absolute lymphocytes counts. *Clin Immunol Immunopathol* 52:19, 1989.
35. HEBERMAN RB. NK cells and other natural effector cells. Academic Press, New York, 1982.
36. How to define, determine, and utilize reference intervals in clinical laboratory. NCCLS Document C28P 12(2), 1992.