

Prueba piloto de validación del método portátil PIMA para el recuento de células CD4 en comparación con la citometría de flujo

Recibido: 20/11/2014 Aceptado: 28/12/2014

Omar Sued¹, Pablo Salgado¹, Camila Picchio¹, María I. Figueroa¹,
María E. Socías¹, Osvaldo Cando², Liliana Díaz²,
Ricardo Hermes², Héctor Pérez³ y Pedro Cahn^{1,3}.

Resumen *Objetivo:* comparar la metodología PIMA con la citometría de flujo convencional para el recuento de linfocitos CD4 en pacientes con infección por HIV.

Métodos: se realizaron determinaciones pareadas en sangre venosa de pacientes con HIV y se comparó la correlación entre ambos resultados.

Resultados: se realizaron 223 determinaciones en forma pareadas. La concordancia fue muy buena, con una correlación lineal de Pearson de 0,974, correlación por rangos de Spearman de 0,971 y con un coeficiente de determinación lineal (R cuadrado) de 0,949 ($p < 0,01$). El coeficiente de correlación intraclases para las medidas individuales fue de 0,965 (IC 95 % 0,926-0,980) y para medidas promedio 0,982 (IC95 % 0,961-0,990). El coeficiente de variación para medidas duplicadas fue bajo siendo 11,4 %.

Discusión: este estudio demuestra una buena correlación entre la determinación de células CD4 con el sistema PIMA frente a la citometría de flujo y apoya el uso de estas metodologías donde no hay acceso a citometría convencional.

Palabras clave: PIMA, citometría de flujo, recuento de CD4.

*Este trabajo se presentó como póster en el XIII Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología realizado en Mar del Plata en el año 2013.

¹Área de Investigaciones Clínicas. Fundación Húésped. Buenos Aires, Argentina.

²Servicio de Laboratorio. H.G.A. Juan A. Fernández. Buenos Aires, Argentina.

³División de Infectología. H.G.A. Juan A. Fernández. Buenos Aires, Argentina.

Dirección para correspondencia:
Dr. Omar Sued.

Pje. Peluffo 3932. C1202ABB CABA. Argentina. TE: 54.11.4981-7777
E-mail: omar.sued@huesped.org.ar

Introducción

En nuestro país se estima que existen 110.000 individuos con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. La garantía de tratamiento gratuito y los avances en atención y tratamiento han permitido reducir la mortalidad casi al 50 %, desde una tasa del 6/100.000 habitantes en 1996 a 3,3/100.000 habitantes en el año 2012 (1). La determinación de los recuentos absolutos de linfocitos T CD4 positivos es esencial para establecer el estado inmunológico de las personas con infección por VIH, lo que marca la necesidad de profilaxis para infecciones oportunistas y la indicación de tratamiento antirretroviral. También es útil para monitorizar la reconstitución inmune, y la respuesta al tratamiento. Tradicionalmente, el método más utilizado para su medición ha sido la citometría de flujo, una metodología relativamente compleja que está disponible habitualmente en centros de referencia, obligando a los centros alejados a mantener una logística que permita recolectar, conservar y derivar las muestras en forma adecuada.

A fin de apoyar la expansión del tratamiento antirretroviral, la OPS y la OMS recomiendan simplificar y optimizar la forma en la que se proporciona el tratamiento antirretroviral mediante la simplificación de los esquemas de tratamiento y la utilización de tecnologías que puedan utilizarse en forma inmediata en el punto de atención (2). Esta política busca reducir la cantidad de personas que no inician el tratamiento oportunamente, y a mejorar el seguimiento de las personas que se encuentran en tratamiento. Desde hace unos años se han empezado a desarrollar varias tecnologías para medir las células T CD4+. Recientemente se ha registrado el sistema de CD4 en el punto de atención PIMA, que permite realizar el recuento de linfocitos T CD3+, CD4+. Este sistema permite el acceso realizar estas mediciones en áreas remotas, no requiere entrenamiento ni mantenimiento intensivo. La mayor disponibilidad de estos métodos, junto con el adecuado control de calidad podría mejorar el seguimiento y la retención de los pacientes. Sin embargo, en Argentina, el uso de esta metodología todavía es limitado y no hay suficiente información sobre la reproducibilidad de los resultados a nivel local.

El objetivo de este trabajo fue comparar los resultados de recuento de células CD4 obtenidos por PIMA frente a los resultados obtenidos por citometría de flujo, en muestras de pacientes en seguimiento en el Servicio de Infectología del Hospital Fernández.

Métodos

Entre Agosto y Octubre de 2012 se solicitó a los individuos con infección por VIH confirmada, mayores de 18 años, que concurrían al servicio de infectología a realizarse una determinación de CD4 su autorización para utilizar un remanente de sangre venosa para evaluar el sistema PIMA. Antes de cargar los tubos de sangre para CD4 se colocó una gota de sangre en el cartucho PIMA y se procedió a insertar el cartucho en el sistema para obtener el resultado siguiendo las instrucciones del fabricante. El cartucho tiene anticuerpos específicos marcados con dos diferentes fluorocromos que emiten luz a dos distintas longitudes de onda (anti-CD3 marcado con colorante 1 y anti CD4 marcado con colorante 2). La muestra teñida se transfiere al canal de detección donde se detectan las señales mediante una cámara integrada. Durante el procesamiento los datos se registran, analizan e interpretan utilizando el *software* integrado. Al finalizar, el cartucho se retira y el equipo muestra el resultado en la pantalla. El equipo se controló diariamente utilizando el cartucho Pima Bead Standard. Los pacientes recibieron únicamente el resultado de CD4 medidos por el método de citometría de flujo.

Los resultados del recuento absoluto de células CD4 obtenido por PIMA se compararon con los resultados del instrumento de referencia, Citómetro Facscalibur (Becton-Dickinson) y se realizó marcación con 4 fluorocromos BD multitest con tubos Trucount CD3/CD8/CD45/CD4 (FITC, PE, PerCP, APC respectivamente) en plataforma única.

El análisis se realizó con *software* estadístico SPSS (versión 20.0) y MedCalc (versión 10.0.2). El porcentaje de similitud de los datos PIMA con los de citometría de flujo se calculó para cada muestra como $100 \times [(PIMA + \text{citometría de flujo}) / 2] / \text{citometría de flujo}$. El porcentaje de similitud se expresa como media de porcentaje de similitud \pm desviación estándar. La distribución normal de similitud se evaluó con la prueba d'Agostino-Pearson. Para comparar las dos mediciones se utilizaron, el *test* de Student para muestras relacionadas y el *test* de Wilcoxon. Para evaluar la correlación lineal se usó el coeficiente de correlación de Pearson y la prueba de correlación de rangos de Spearman. Se analizó la regresión lineal (recta de mínimos cuadrados). Para evaluar el grado de acuerdo entre los resultados de las pruebas pareadas de ambos instrumentos se aplicó el coeficiente de correlación de concordancia que evalúa el grado en que pares de observaciones caen sobre la línea de 45° que pasa por el ori-

gen. Este tipo de análisis también contiene una medida de precisión (Pearson correlación r) y la precisión (factor de corrección de sesgo C_b), que ambos pueden variar entre cero y uno. Se aplicó un análisis de regresión de Passing y Bablok a los datos sin supuestos especiales con respecto a la distribución de las muestras y la medición de valores extremos. Se realizaron análisis de Bland-Altman y Pollock para calcular el sesgo de la media y los límites de acuerdo (LOA) usando los intervalos de confianza del 95 % ($\pm 1,96 \times SD$) de la media de las desviaciones de todos los pares de mediciones. Para medir la sensibilidad / especificidad del dispositivo de PIMA para comparar diferentes rangos de CD4 (valores de corte de 200, 400 y 500) considerando la citometría de flujo como el patron de oro.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Fundación Huésped, se llevó a cabo siguiendo las buenas prácticas clínicas y todos los pacientes dieron su consentimiento escrito antes de la toma de la muestra.

Resultados

Se realizaron 223 determinaciones en forma pareadas. Se eliminaron 9 pares considerados desviaciones extremas, que se presentaban tanto a valores bajos como altos. La utilización de PIMA se asoció a un conteo menor de CD4: la media de células por citometría de flujo fue 515,6 y por PIMA 477,6 con una diferencia de medias: $-38,0 \pm 70,8$; IC95 % (-47,6; -28,5); $p < 0,01$ aunque este valor no se consideró clínicamente significativo.

La concordancia fue muy buena, con una correlación lineal de Pearson de 0,974, correlación por rangos de Spearman de 0,971 y con un coeficiente de determinación lineal (R cuadrado) de 0,949 ($p < 0,01$). El coeficiente de correlación intraclass para las medidas individuales fue de 0,965 (IC 95 % 0,926-0,980) y para medidas promedio 0,982 (IC95 % 0,961-0,990). La ecuación de la recta de mínimos cuadrados es $PIMA\ CD4 = 6,8 + FACSCalibur * 0,913$. La regre-

sión e Passing y Bablok que compara una recta de 45° es $PIMA\ CD4 = 8,40 + FACSCalibur * 0,923$ siendo no significativo ($p = 0,40$) el *test* de desviación de linealidad. El coeficiente de variación para medidas duplicadas fue bajo siendo 11,4 %.

La correlación y sus variaciones se graficaron con varios métodos. En el gráfico 1 podemos observar la dispersión de puntos entre los dos métodos y la recta de mínimos cuadrados con el IC95 % individual. En el gráfico 2 A se observa el método Bland y Altman de distribución de la diferencia entre los dos métodos, siendo muy pocos puntos los que superan el IC95 %. En el gráfico 2 B se observa el método de Bland y Altman de distribución de la diferencia en porcentaje entre los dos métodos, son pocos los valores que se encuentran fuera del IC95 % y en valores muy bajos de CD4. En el gráfico 3 A y B usando el método de Passing y Bablok en la regresión de los residuos (Gráfico 3 A): se observa que la dispersión se mantiene constante a lo largo de los valores de CD4 y que además la nube de puntos ajusta a la recta de 45° (Gráfico 3B).

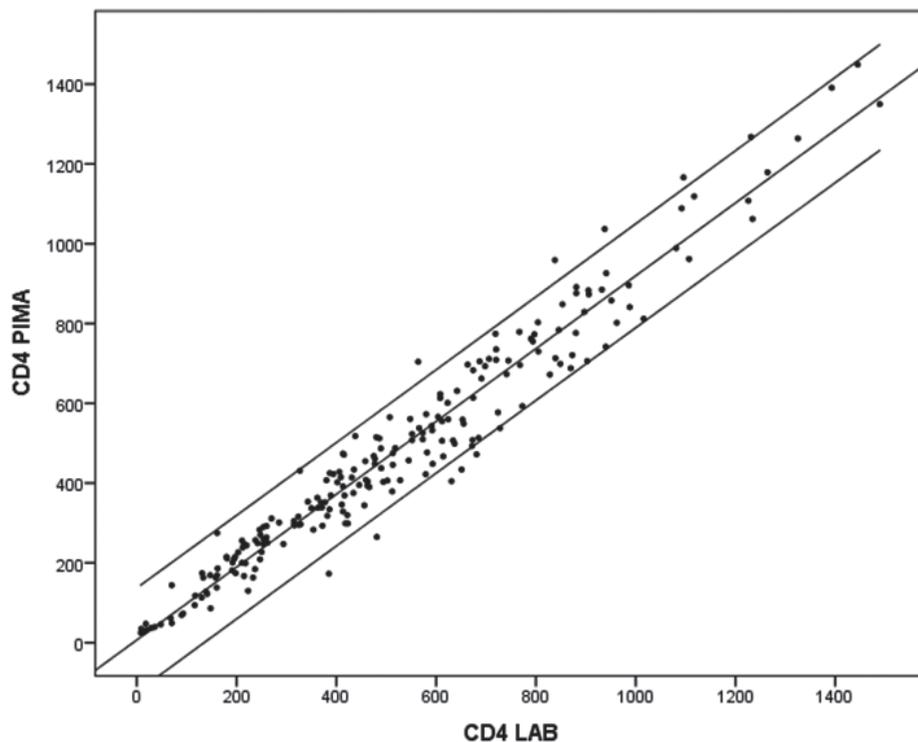


Gráfico 1: Coeficiente de correlación lineal, que muestra la recta de mínimos cuadrados y el la banda de confianza para los puntos individuales al 95 %. CD4 LAB: citometría de flujo.

Gráfico 2: Método de Bland y Altman

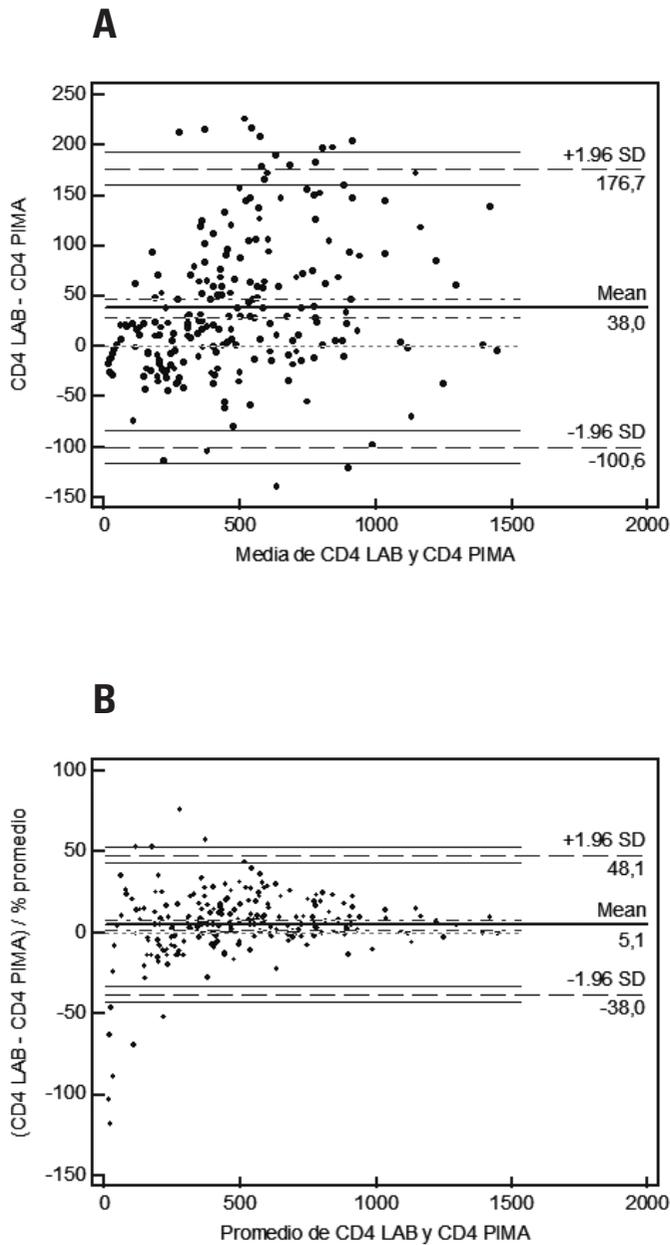


Gráfico 2. Gráficos de Bland y Altman mostrando la distribución de la diferencia en números absolutos (A) y la distribución de la diferencia en porcentaje (B) entre los dos métodos. CD4 LAB: citometría de flujo.

Gráfico 3. Gráfico de Passing y Bablok

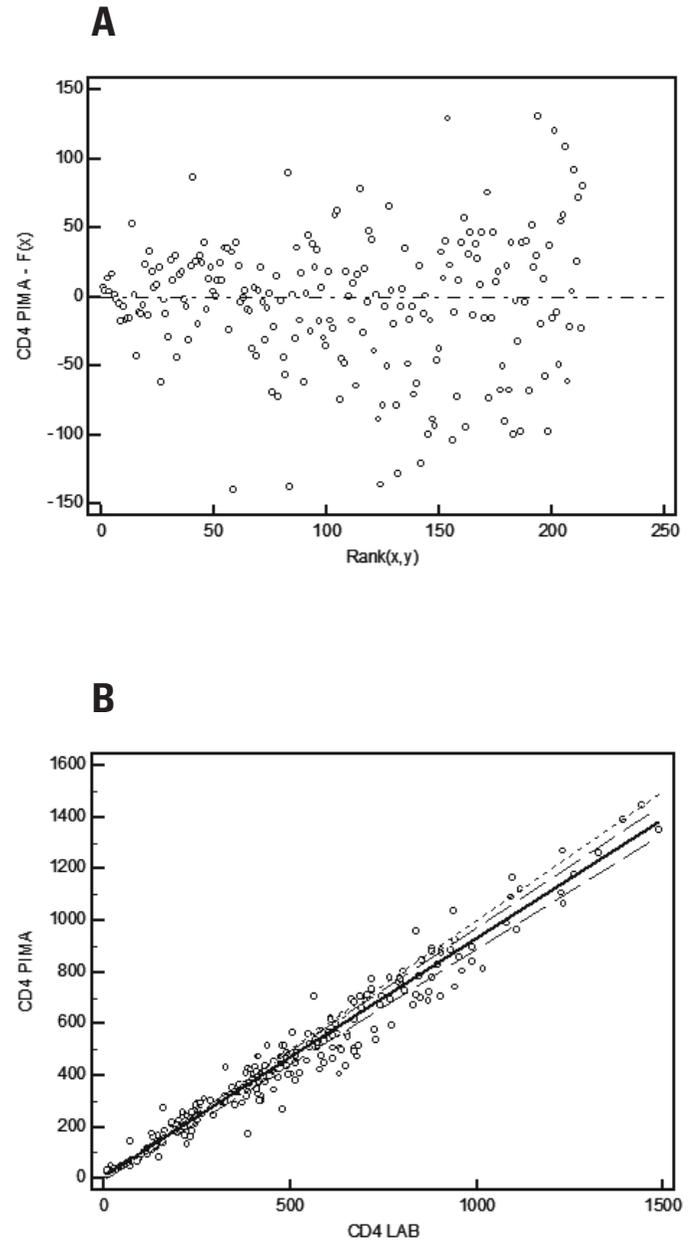


Gráfico 3. Gráfico de Passing y Bablok regresión de los residuos: se observa que la dispersión se mantiene constante a lo largo de los valores de CD4 (A) y comparados con una recta de 45 grados (B). CD4 LAB: citometría de flujo.

Considerando la citometría como el estándar de oro, a valores de 200, 400 y 500 células/mm³ la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo son adecuados y se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad y valores predictivos del método

Valor de corte CD4 = 200 cél/mm ³	Porcentaje	95 % I.C.	
		Límite inferior	Límite superior
Pacientes correctamente diagnosticados	93,93 %	90,72 %	97,13 %
Sensibilidad	82,35 %	69,54 %	95,17 %
Especificidad	96,11 %	93,29 %	98,94 %
Valor predictivo positivo	80,00 %	66,75 %	93,25 %
Valor predictivo negativo	96,65 %	94,01 %	99,28 %
Cociente de probabilidades positivo	21,176	10,076	44,507
Cociente de probabilidades negativo	0,184	0,089	0,38
Valor de corte CD4 = 400 cél/mm ³			
Pacientes correctamente diagnosticados	91,59 %	87,87 %	95,31 %
Sensibilidad	95,18 %	90,57 %	99,79 %
Especificidad	89,31 %	84,02 %	94,60 %
Valor predictivo positivo	84,95 %	77,68 %	92,21 %
Valor predictivo negativo	96,69 %	93,51 %	99,88 %
Cociente de probabilidades positivo	8,906	5,416	14,646
Cociente de probabilidades negativo	0,054	0,021	0,141
Valor de corte CD4 = 500 cél/mm ³			
Pacientes correctamente diagnosticados	91,12 %	87,31 %	94,93 %
Sensibilidad	97,39 %	94,48 %	100,30 %
Especificidad	83,84 %	76,59 %	91,09 %
Valor predictivo positivo	87,50 %	81,77 %	93,23 %
Valor predictivo negativo	96,51 %	92,63 %	100,39 %
Cociente de probabilidades positivo	6,026	3,844	9,448
Cociente de probabilidades negativo	0,031	0,01	0,095

Discusión

Nuestro estudio demostró que la metodología PIMA resulta en una buena concordancia con el método de cuantificación de células CD4 por citometría de flujo aunque consistentemente el resultado es ligeramente menor.

La buena concordancia apoya su uso para el recuento de CD4, tanto para inicio como para monitoreo de tratamiento. Además otras características del equipo lo hacen apropiado para apoyar procesos de descentralización, en particular en centros con bajo volumen de pacientes, entre las que se incluyen su pequeño tamaño, la posibilidad de transportarlo a varios centros en un área determinada y poder ser usado con batería o luz eléctrica. Además, los reactivos no requieren refrigeración, el equipo no requiere calibración y puede ser realizado por técnicos con mí-

nimo entrenamiento. El costo del equipo y de los reactivos es una característica a considerar. A diferencia de la citometría de flujo, el sistema Pima no requiere reactivos adicionales ni cadena de frío, espacio con aire acondicionado ni servicio de mantenimiento. El costo del equipo PIMA es aproximadamente el 25 % del costo de un citómetro convencional.

Los resultados obtenidos son similares a varios estudios realizados en otros países. Un estudio previo con 111 muestras de pacientes con VIH de Senegal mostró un coeficiente interno de variación de Pima de menos de 29 células CD4 (dentro del valor de 35 cél/mm sugerido por la compañía). Este estudio además demostró que Pima tiene una mejor correlación, concordancia y similitud con BD FACS que el sistema CyFlow counter (3). Otro estudio en 165 pacientes en Zimbabue demostró que es fácil integrar esta metodología en centros de testeo, sin un entrenamiento específico (4). Un estudio multicéntrico que incluyó 300 pacientes con o sin infección por HIV demostró también una buena correlación, que fue mejor cuando se realizaba en sangre venosa que en sangre arterial (5). Existe una experiencia en Londres donde además se demostró que el método es más aceptable para los pacientes (6).

En nuestro país la cobertura de tratamiento antirretroviral está avanzando paulatinamente, con el correspondiente aumento de la necesidad de descentralizar procesos de diagnóstico y tratamiento. En el interior del país la disponibilidad de citometría de flujo está limitada a laboratorios de referencia. Aunque existen sistemas de referencias y transporte de la muestra, en muchas ocasiones la falta de tecnología local se traduce en pérdidas de oportunidad para realizar determinaciones por dificultades logísticas para programar extracción y derivación de muestras o porque el paciente no puede pagarlos o desplazarse a centros donde los realicen en forma gratuita. Si se contara ampliamente con metodologías locales simples se podrían acelerar los tiempos de evaluación e inicio de tratamiento, lo que en algunos estudios ha demostrado reducir la mortalidad temprana por HIV. Las metodologías rápidas han demostrado que pueden mejorar la retención en los escalones iniciales de la cascada de atención al permitir una evaluación de la necesidad de tratamiento casi inmediata (7,8).

Este estudio tiene varias limitaciones. Es un diseño transversal, sin seguimiento, el estándar de oro que se utiliza tiene una precisión limitada, por lo que un resultado discordante es difícil de atribuir a una o a otra metodología y finalmente, el número de pacientes fue limitado debido a las limitaciones de tiempo y recursos.

Sin embargo este es el primer estudio de concordancia de pacientes HIV positivos con y sin tratamiento antirretroviral evaluando PIMA frente a citometría de flujo en Argentina y los resultados demuestran una

alta correlación y apoyan el uso de esta metodología donde no hay acceso a citometría convencional.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a Zulma Lovay, Norma Valdez y Nibia Trias, quienes realizaron las extracciones y determinaciones de laboratorio. Para este estudio no se contó con financiamiento específico, no se realizaron pagos a los profesionales ni a los voluntarios. El laboratorio Alere donó 100 reactivos y cedió en calidad de préstamo no condicionado el equipo.

Referencias

1. Dirección de SIDA y ETS Boletín sobre VIH-SIDA en Argentina, Año XVI, N° 30, Diciembre 2013. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/sida/images/stories/5-comunicacion/pdf/2013-11-28_boletin-epidemiologico-30.pdf.
2. World Health Organization. Consolidated treatment guidelines for the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Recommendations for a Public Health Approach 2013; <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/en/>.
3. Wade D, Diaw PA, Daneau G, et al. CD4 T-cell enumeration in a field setting: evaluation of CyFlow counter using the CD4 easy count kit-dry and Pima CD4 systems. *PloS one* 2013;8:e75484.
4. Mtapuri-Zinyowera S, Chideme M, Mangwanya D, et al. Evaluation of the PIMA point-of-care CD4 analyzer in VCT clinics in Zimbabwe. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2010;55:1-7.
5. Diaw PA, Daneau G, Coly AA, et al. Multisite evaluation of a point-of-care instrument for CD4(+) T-cell enumeration using venous and finger-prick blood: the PIMA CD4. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2011;58:e103-11.
6. Herbert S, Edwards S, Carrick G, et al. Evaluation of PIMA point-of-care CD4 testing in a large UK HIV service. *Sexually transmitted infections* 2012;88:413-7.
7. Wynberg E, Cooke G, Shroufi A, Reid SD, Ford N. Impact of point-of-care CD4 testing on linkage to HIV care: a systematic review. *Journal of the International AIDS Society* 2014;17:18809.
8. Larson BA, Schnippel K, Ndibongo B, et al. Rapid point-of-care CD4 testing at mobile HIV testing sites to increase linkage to care: an evaluation of a pilot program in South Africa. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2012;61:e13-7.9.

Pilot validation study of the PIMA portatil platform for the CD4 T-cell enumeration compared to flux cytometry

Summary Objective: To compare PIMA methodology to the standard CD4 FACSCalibur flow cytometry for CD4 testing.

Method: Paired blood samples were collected among HIV patients and tested using PIMA and Becton Dickinson FACSCalibur.

Results: 223 samples were studied in parallel. There was a high concordance, being Pearson Linear Correlation 0.974, the Spearman Rank Correlation Coefficient 0.971. The Intraclass Correlation Coefficient for individual measures was 0.965 (95%CI 0.926-0.980) and for average measures 0.982 (95%CI 0.961-0.990). There was a low coefficient of variation from duplicate measurements (11.4%).

Conclusion: This study shows a good correlation between the PIMA CD4 count and the Becton Dickinson FACSCalibur. By being a point of care methodology that produces same-day results, PIMA CD4 might be an alternative for sites without access to standard CD4 count methodology.

Key words: PIMA, Flow Citometry, CD4 count.