



PESQUISA DE LEUCÓCITOS RESIDUAIS

A. Ferreira, A. Nogueira, A. Afonso, C. Koch, R. Pereira
Serviço de Imunohemoterapia, Hospital de S. João, Porto

INTRODUÇÃO:

A presença de leucócitos nos concentrados de eritrócitos (CE) e nos concentrados de plaquetas (CP) está associada a uma maior incidência de reacções febris, com transmissão de citomegalovírus (CMV) e aloimunização a antígenos HLA em indivíduos transfundidos.

A exigência de componentes sanguíneos pobres em leucócitos implica a existência de um controlo relativamente à persistência dos leucócitos residuais. O método de detecção e contagem dos mesmos deve ter alta sensibilidade, razão pela qual é escolhida a citometria de fluxo para o estudo das amostras, sendo os valores obtidos comparados com os valores exigidos pelo Conselho da Europa. Para o CP o valor dos leucócitos residuais após filtração pelo método PRP, deve ser inferior a 0.2×10^6 /unidade; pelo método de buffy coat no qual ainda não houve desleucocitação, estes valores devem ser inferiores a 0.05×10^9 /unidade. Relativamente aos CE desleucocitados, os valores dos leucócitos residuais devem ser inferiores a 1×10^6 /unidade.

A citometria de fluxo é um método quantitativo de análise de partículas em suspensão. O princípio do método consiste na passagem de tais partículas (células, núcleos, DNA) em suspensão, alinhadas uma a uma frente a um feixe de luz.

MÉTODO:

Aquando da obtenção dos componentes sanguíneos, escolhem-se aleatoriamente quatro unidades de concentrado de eritrócitos e as quatro unidades correspondentes de concentrado de plaquetas, obtidas pelo método PRP (plasma rico em plaquetas) e igual número de unidades obtidas pelo método de "buffy coat". A 100 μ l de cada uma destas amostras adicionamos 400 μ l do reagente, que contém fluorocromo iodeto de propídeo (IP), rnase, detergente e tampão e adquirimos no citómetro.

Para permitir o cálculo do número absoluto de leucócitos residuais é usado um número conhecido de esferas fluorescentes (esferas de referência), próximo de 50000, contidas nos tubos.



RESULTADOS:

As amostras são adquiridas no citómetro de fluxo e analisadas mediante um programa informático. Os dados são representados no gráfico de pontos "dot plot" onde são definidos duas regiões: a região R1 onde se localizam as esferas de referência e a região R2 dentro da qual se localizam os leucócitos.

Os pontos registados em R1 e R2 reportam as informações necessárias para a realização do cálculo do número de leucócitos totais pela fórmula:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de células em R2}}{\text{n}^\circ \text{ de pontos em R1}} \times \frac{\text{n}^\circ \text{ de esferas do tubo}}{\text{volume da amostra } (\mu\text{l})} = \text{n}^\circ \text{ total de células}/\mu\text{l}$$

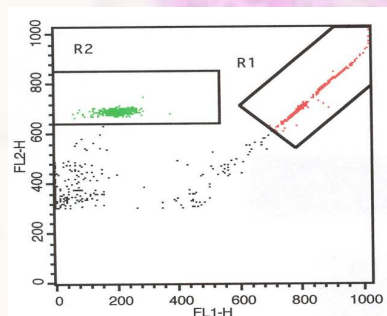


Figura 1: leucócitos residuais de CP obtido pelo método de Buffy coat

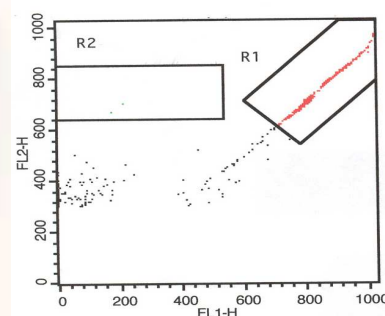


Figura 2: leucócitos residuais de CP obtido pelo método PRP

DISCUSSÃO:

O CP obtido pelo método Buffy coat apresenta uma concentração final de leucócitos residuais significativamente superior ao CP obtido pelo método PRP, como se pode observar nas regiões R2 das figuras 1 e 2. Pelo método de Buffy coat o CP não é filtrado aquando de seu processamento, como acontece no método PRP, o que justifica os resultados obtidos.

A amostra representada na figura 1 apresenta uma concentração de 24.78 leucócitos/ μ l correspondente a 0.001×10^9 /unidade CP, o que está de acordo com os valores exigidos pelo conselho da Europa.

A amostra representada na figura 2 apresenta uma concentração de 0.10 leucócitos/ μ l correspondente a 0.005×10^6 /unidade CP, o que está de acordo com os valores exigidos pelo Conselho da Europa.

CONCLUSÃO:

A citometria de fluxo permite quantificar os leucócitos residuais dos diferentes componentes sanguíneos, avaliando a conformidade ou não conformidade com as normas exigidas pelo conselho da Europa.