Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

Estandarización del citómetro de flujo Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos en un laboratorio privado de Lima, 2021

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Sany Naína GONZÁLES SARAVIA

ASESOR

Ricardo Mafalky RODRÍGUEZ TORRES

Julia Luisa Moya Naranjo (Coasesor)

Lima, Perú

2022

Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Gonzáles S. Estandarización del citómetro de flujo Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos en un laboratorio privado de Lima, 2021 [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Sany Naína Gonzáles Saravia
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	72169438
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4305-7886
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Ricardo Mafalky Rodríguez Torres
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10426839
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-6341-011X
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Julia Luisa Moya Naranjo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	40658019
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-6338-154X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Eduardo Augusto Verastegui Lara
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10686383
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Miguel Arturo Vásquez Medina

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10049097
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Pierina Cecilia Donayre Medina
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	46474892
Datos de investigación	
Línea de investigación	C.0.3.1 Automatización en adquisición de datos.
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Cytometric Bioservices País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Luis Calle: Av. Del Aire 1308 Latitud: -12.07722 Longitud: -76.99713
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2021-2022
URL de disciplinas OCDE	Tecnología Médica de Laboratorio https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.06.02 Ingeniería Médica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.06.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú, Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

UNMSM Firmado digitalmente por FERNANDEZ GIUSTI VDA DE PELLA Alicia Jesus FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 07.11.2022 12:33:32 -05:00

UNMSM Firmado digitalmente por SANDOVAL VEGAS Miguel Hernan FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 05.11.2022 07:00:52 -05:00

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Mg. Eduardo Augusto Verástegui Lara
Miembros: Mg. Miguel Arturo Vásquez Mendoza
Mg. Pierina Cecilia Donayre Medina
Asesor(a): Lic. Ricardo Mafalky Rodríguez Torres

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 04 de noviembre del 2022, siendo las 10:00 horas, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **"Estandarización del citómetro de flujo Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos en un laboratorio privado de Lima, 2021"**, para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica de la Señorita:

SANY NAÍNA GONZÁLES SARAVIA

Habiendo obtenido el calificativo de:

…… 19 …….
(En números)

……Diecinueve……
(En letras)

Que corresponde a la mención de: …….Sobresaliente…….
Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta

……
Presidente
Mg. Eduardo Augusto Verástegui Lara
D.N.I: 10686383

……
Miembro
Mg. Miguel Arturo Vásquez Mendoza
D.N.I: 10049097

……
Miembro
Mg. Pierina Cecilia Donayre Medina
D.N.I: 46474892

……
Asesor(a) de Tesis
Lic. Ricardo Mafalky Rodríguez Torres
D.N.I: 10426839

Datos de plataforma virtual institucional del acto de sustentación:
https: **https://us02web.zoom.us/j/85037018575?pwd=ZjFOTW1vQStYQmFaWVRJWUFjSkNmZz09**
ID:
Grabación archivada en:

INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

El Director de la Escuela Profesional de Tecnología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos que suscribe, hace constar que:

El autor: **SANY NAÍNA, GONZÁLES SARAVIA**

de la tesis para optar el título profesional de Licenciado(a) en Tecnología Médica, en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica,

Titulada:
"Estandarización del citómetro de flujo Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos en un laboratorio privado de Lima, 2021"

Presentó solicitud de evaluación de originalidad el 12 de octubre del 2022 y el 13 de octubre del 2022 (UTC-0500) se aplicó el programa informático de similitudes en el software TURNITIN con Identificador de la entrega N°: **1924235904**

En la configuración del detector se excluyó:
- textos entrecomillados.
- bibliografía.
- cadenas menores a 40 palabras.
- anexos.

El resultado final de similitudes fue del 3 %, según consta en el informe del programa TURNITIN.

EL DOCUMENTO ARRIBA SEÑALADO CUMPLE CON LOS CRITERIOS DE ORIGINALIDAD
Operador del software el profesor: Dr. Miguel Hernán Sandoval Vegas.

Lima, 13 de octubre del 2022.

UNMSM
Firmado digitalmente por SANDOVAL VEGAS Miguel Hernan FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 13.10.2022 17:22:20 -05:00

Escuela Profesional de Tecnología Médica FACULTAD DE MEDICINA DIRECCIÓN U.N.M.S.M.

.....
Dr. MIGUEL HERNÁN SANDOVAL VEGAS
DIRECTOR
EPTM-FM-UNMSM

Título:

ESTANDARIZACIÓN DEL CITÓMETRO DE FLUJO NOVOCYTE ADVANTEON PARA EL ANÁLISIS AUTOMATIZADO DE LINFOCITOS EN UN LABORATORIO PRIVADO DE LIMA, 2021

Autor:

SANY NAÍNA GONZÁLES SARAVIA

Asesor:

Lic. RICARDO MAFALKY RODRIGUEZ TORRES

Co asesora:

Mg. JULIA LUISA MOYA NARANJO

Dedicatoria:

A mi familia, en memoria de mi abuela Teolinda que siempre me impulsó a estudiar y seguir mis metas. En especial A mis padres, hermanos, tía Graciela por su apoyo a lo largo de este camino, por motivarme a continuar este proceso y motivarme a seguir mis sueños. A mis primos por su apoyo y enseñanzas durante mi etapa estudiantil.

Agradecimientos:

A Dios por darme la fortaleza para superar cada obstáculo a lo largo de este camino.

A mis asesores Lic. Ricardo Rodríguez por la paciencia y el apoyo en el desarrollo de la tesis, a Julia Moya por confiar en mis ideas, compartir sus conocimientos y motivarme a continuar con este proyecto.

Al Dr. Dyer y el Ing Zafra por la confianza y brindarme la oportunidad de ingresar al mundo de la citometría de flujo. A mis compañeros y ex compañeros del laboratorio de citometría de flujo por compartir sus conocimientos, motivarme y contribuir de distintas maneras a lo largo de este camino

Al Dr. Yupanqui y la Dra. Danitza del laboratorio Biolab por las facilidades para el uso de instalaciones.

A Macarena Izquierdo y el grupo de soporte de Cytognos por las asesorías en el uso de la base de datos e interpretación. A la Dra. Elaine Sobral y el Dr. Joel de León por sus aportes y sugerencias.

ÍNDICE

1 LISTA DE TABLAS vi
2 LISTA DE GRÁFICOS vii
3 RESUMEN EN ESPAÑOL viii
4 ABSTRACT ix
1 CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN 1
1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES 2
1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN 9
1.3 OBJETIVOS 10
1.3.1 Objetivo general 10
1.3.2 Objetivos específicos 10
1.4 BASES TEÓRICAS 11
1.4.1 BASE TEÓRICA 11
1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS 27
1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS 29
2 CAPITULO II: MÉTODOS 30
2.1 DISEÑO METODOLÓGICO 31
2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN 31
2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN 31
2.1.3 POBLACIÓN 31
2.1.4 MUESTRA Y MUESTREO 31
2.1.5 VARIABLES 32
2.1.6 TÉCNICAS E INTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS 32
2.1.7 PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS 38
2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS 38
3 CAPITULO III: RESULTADOS 39
4 CAPITULO IV: DISCUSIÓN 53
5 CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 57
5.1 CONCLUSIONES 58
5.2 RECOMENDACIONES 59
6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 60
7 ANEXOS 64

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: Longitudes de onda de excitación y emisión máximas para fluorocromos

TABLA 2: Configuración óptica de los equipos en los que se logró la estandarización EuroFlow™.

TABLA 3: Configuración de láseres de los equipos en los que se logró la estandarización EuroFlow™.

TABLA 4: Fluorocromos propuestos por EuroFlow™ que pueden ser leídos en Novocyte Advanteon.

TABLA 5: Anticuerpos del Kit LST

TABLA 6: Descripción fenotípica de las poblaciones identificadas en LST

TABLA 7: Descripción fenotípica de las poblaciones identificadas en LST

TABLA 8: Porcentaje de pérdida celular promedio tomando en cuenta los leucocitos totales entre los diferentes lisantes.

TABLA 9: Frecuencia de las poblaciones celulares en sangre periférica con los diferentes lisantes probados.

TABLA 10: Comparación por pares para Basófilos entre Facs Lysing y los lisantes en evaluación.

TABLA 11: Stain Index (Cálculo de la separación entre el debris y linfocitos en FSC)

TABLA 12: Evaluación de los lisantes basándose en las medias y desviación estándar

TABLA 13: Evaluación de la pérdida de florescencia (IFM) respecto al lisante de referencia.

TABLA 14: Prueba de Bonferroni para los IFM de PE de los fluorocromos.

TABLA 15: Prueba de Bonferroni para los IFM de APC de los fluorocromos.

TABLA 16: Coeficientes de variación de los fluorocromos.

TABLA 17: Prueba de Bonferroni para los CV de PE de los fluorocromos.

TABLA 18: Prueba de Bonferroni para los CV de PB de los fluorocromos.

TABLA 19: Valores de Target de IFM y CV de Novocyte Advanteon.

TABLA 20: Comparación de poblaciones celulares y linfocitarias del kit LST entre Novocyte Advanteon y el instrumento de referencia.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Superposición de las longitudes de onda de PE y FITC.

GRÁFICO 2: Algoritmo de identificación de la base de datos.

GRÁFICO 3: Algoritmo usado para el reconocimiento de las poblaciones reactivas/normales LST

GRÁFICO 4: Superposición gráfica de las diferentes subpoblaciones en FSC/SSC

GRÁFICO 5: Evaluación de la pérdida de Intensidad de Fluorescencia Media por los lisantes

GRÁFICO 06: Archivo procesado con el lisante e instrumento de referencia y analizado en la base de datos.

GRÁFICO 7: Archivo procesado con el lisante Excellyse I, adquirido en Novocyte Advanteon y analizado en la base de datos.

GRÁFICO 8: Evaluación de las correlaciones de los porcentajes celulares entre el instrumento de referencia y Novocyte Adavanteon.

RESUMEN EN ESPAÑOL

INTRODUCCIÓN: La estandarización en citometría de flujo está destinada a mejorar la reproducibilidad de los resultados entre distintos instrumentos y centros. Sin embargo, las diferencias en las configuraciones ópticas entre los distintos fabricantes, así como la falta de protocolos estándar, dificultan el proceso. La necesidad de obtener información objetiva y reproducible en los que apoyar la toma de decisiones diagnósticas, es un requisito obligatorio de cualquier prueba diagnóstica, incluida la citometría de flujo. Algunos grupos científicos han propuesto modelos de estandarización, entre ellos el consorcio Euroflow que actualmente es el más usado en Latinoamérica y Perú para el estudio de Neoplasias hematológicas; sin embargo, no existen protocolos para Novocyte Advanteon. **OBJETIVOS:** Desarrollar la estandarización del citómetro Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos, utilizando la base de datos, en un laboratorio privado de Lima, 2021. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se evalúa la estandarización de Novocyte Advanteon (Agilent, EEUU) tomando como instrumento y lisante de referencia Facs Canto II y Facs Lysing respectivamente (BD Biosciences, EEUU) Para esto se planteó un protocolo de 3 etapas: Evaluación y elección de lisante (10 muestras de Sangre periférica, Obtención de valores target (Rainbow Beads y 3 muestras de sangre periférica) y Evaluación de la estandarización mediante la base de datos (20 muestras de SP). **RESULTADOS:** En la evaluación de lisantes se seleccionó el lisante Excellyse I por la mejor superposición con el lisante e instrumento de referencia, sin pérdida significativa de poblaciones celulares ni fluorescencia ($p<0.05$). Los valores Target obtenidos basándose en las Rainbow Beads (Spherotec, EEUU) fueron evaluados en el último paso, obteniéndose reconocimiento automático de las poblaciones >95% por la base de datos automatizada en muestras de sangre periférica de donantes sanos, los porcentajes de las poblaciones celulares entre Novocyte Advanteon y el instrumento de referencia mostraron buena correlación >0.96 con significancia estadística ($p<0.05$). **CONCLUSIONES:** Los resultados obtenidos demuestran que es posible la estandarización del citómetro Novocyte Advanteon bajo el protocolo planteado para el análisis automatizado de linfocitos mediante el uso de la base de datos del Software Infinicyt 2.0 comparables a los obtenidos bajo las recomendaciones del consorcio EuroFlow™.

PALABRAS CLAVE: Estandarización, lisantes, Base de datos, Inmunofenotipo, LST.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Standardization in flow cytometry is intended to improve the reproducibility of results between different instruments and centers. However, differences in optical configurations between manufacturers as well as the lack of standard protocols hinder the process. The need to obtain objective and reproducible information to support diagnostic decision making is a mandatory requirement for any diagnostic test including flow cytometry. Some scientific groups have proposed standardization models among them the Euroflow consortium which is currently the most used in Latin America and Peru for the study of hematological neoplasms; however there are no protocols for Novocyte Advanteon. **OBJECTIVES:** To develop the standardization of the Novocyte Advanteon cytometer for automated lymphocyte analysis, using the database, in a private laboratory in Lima, 2021. **MATERIALS AND METHODS:** The standardization of Novocyte Advanteon was evaluated using Facs Canto II and Facs Lysing (BD Biosciences, USA) as the reference instrument and lysing agent: Evaluation and choice of lysing agent (10 peripheral blood samples, Obtaining target values (Rainbow Beads and 3 peripheral blood samples) and Evaluation of standardization using the database (20 SP samples). **RESULTS:** In the evaluation of lysates, Excellyse I lysate was selected for the best overlap with the reference lysate and instrument, without significant loss of cell populations or fluorescence (p95% populations by the automated database in peripheral blood samples from healthy donors, the percentages of cell populations between Novocyte Advanteon and the reference instrument showed good correlation >0.96 with statistical significance ($p<0.05$). **CONCLUSIONS:** The results obtained demonstrate that it is possible to standardize the Novocyte Advanteon cytometer under the protocol proposed for automated lymphocyte analysis using the Infinicyt 2.0 Software database comparable to those obtained under the EuroFlow™ consortium recommendations.

KEY WORDS: Standardization, lysates, Database, Immunophenotyping, LST.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

Los citómetros de flujo son instrumentos capaces de medir simultáneamente características físicas y químicas de diversas partículas al pasar alineadas a través de una fuente de luz a alta velocidad. Las diferencias en la configuración óptica, detectores, escalas entre fabricantes y el uso de paneles a criterio de cada laboratorio dificulta la obtención de archivos comparables. Asimismo, al análisis manual convierte a la citometría en una práctica dependiente de la experiencia y conocimiento del usuario(1). Por esta razón, diversos grupos y consorcios internacionales establecieron consensos para disminuir la variabilidad y subjetividad en el análisis, mediante el desarrollo de paneles y estrategias estandarizadas que permiten el diagnóstico automatizado en menor tiempo y siguiendo lineamientos de calidad.

La estandarización en citometría de flujo es un procedimiento compuesto por un conjunto de pasos destinados a mejorar la reproducibilidad de los resultados en los laboratorios durante un tiempo prolongado, entre diferentes instrumentos y centros de distintas regiones geográficas.

El inmunofenotipo por citometría de flujo es parte de las estrategias diagnósticas para el estudio, clasificación y seguimiento de neoplasias hematológicas e inmunodeficiencias. (2) Con el lanzamiento de nuevos citómetros, paneles cada vez más amplios y la aparición de nuevas tecnologías, se ha conseguido un mejor reconocimiento de los perfiles antigénicos que permite detectar, caracterizar y clasificar células dentro de poblaciones heterogéneas.

Tanto en Latinoamérica y Perú, uno de los protocolos con mayor reconocimiento y aplicación pertenece al consorcio EuroFlow™ (3); sin embargo, su implementación está limitada a equipos e insumos de marcas específicas. En la actualidad, no existen recomendaciones publicadas para el citómetro Novocyte Advanteon (Angilent, 2019). La literatura reporta el intento de adecuación para una versión anterior Novocyte 3005 (Angilent, 2014) (4), la cual no fue posible por condiciones particulares de la versión (voltajes fijos y detectores compartidos). En este estudio se plantea realizar los ajustes pertinentes en el instrumento de estudio en base al citómetro Facs Canto II (BD Bioscience, San José, USA), para alcanzar condiciones

homólogas y compatibilidad con la base de datos estandarizada Infinicyt™ versión 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España) construida en base a protocolos estandarizados.

La adaptación de un instrumento de citometría de flujo, para protocolos de análisis de linfocitos partiendo de un procedimiento estandarizado requiere de: establecer voltajes de los fotomultiplicadores utilizando perlas fluorescentes, elección de la solución lisante; evaluación de la homologación de datos y resultados.(5)

En diversas investigaciones, los grupos científicos relacionados han presentado diferentes propuestas, en algunas abarcan todo el proceso de análisis, mientras otros toman una parte como se detalla en los siguientes antecedentes.

Cornel et al. (2020). [(6)] Tuvo como objetivo investigar si los citómetros de flujo Facs Canto II y LSR Fortessa (BD Bioscience, San José, USA) pueden ser armonizados usando perlas de calibración. Para ello se emplearon 4 instrumentos, armonizados con perlas de calibración y perlas de superficie marcadas individualmente. Para evaluar la armonización se tiñeron 5 muestras de controles sanos y fueron analizados con ambos protocolos. Bajo el criterio de comparabilidad <15% de variación. Se observó que utilizando el protocolo de sincronización con perlas de calibración no cumplían el criterio establecido, sin embargo, bajo el protocolo de perlas de coincidencia espectral, los criterios de comparación fueron exitosos. En conclusión, se demostró que ambos citómetros pueden ser armonizados tomando en cuenta las perlas de superficie teñidas de un solo fluorocromo que resulta en la disminución de las desviaciones entre los instrumentos.

Kalina T. (2020) [(1)] proporciona una descripción general de cómo varios consorcios abordaron la estandarización: EuroFlow™, The ONE study, Human Inmunology Proyect Consortium (HIPC) y varios otros grupos; se señalan los objetivos particulares, herramientas adoptadas para alcanzarla y cómo evaluaron los resultados, Finalmente concluye que la estandarización completa es importante no solo para la reproducibilidad de las mediciones sino para la educación, evaluación de calidad y el análisis algorítmico de datos. Los diferentes enfoques estandarizados

pueden servir como herramientas de referencia de evaluación comparativa para el desarrollo de futuros estudios de citometría de flujo.

Novákova M. et al. (2019) [4] Describió las adaptaciones específicas necesarias en la configuración de instrumentos distintos a los utilizados por el grupo EuroFlow™, para permitirles adquirir muestras procesadas bajo los protocolos estandarizados de 8 colores. Se observó que cuando los instrumentos difieren en rango dinámico (escala) y filtros de emisión, no basta con recalcular los valores objetivos a la escala, ya que el ajuste de los voltajes PMT a un filtro de emisión y fluorocromo determinados es esencial. Para esto se usaron beads tipo IIB (coincidencia espectral) para configurar mediciones de fluorescencia estandarizada y comparables en instrumentos de diferentes fabricantes como Facs Canto II, Navios y MACSQuant. Se concluyó que luego de los ajustes descritos las adquisiciones en cualquiera de las plataformas podían superponerse, el enfoque propuesto se puede usar para derivar valores Target para cualquier combinación de fluorocromos espectralmente distintos y cualquier filtro de emisión distintos de cualquier nueva plataforma de citometría de flujo.

De acuerdo con H. Glier et al. (2019) [7] se examinaron las particularidades de la estandarización EuroFlow™ en tres citómetros de flujo diferentes Navios (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), BD Facs Canto II y BD Facs Lyrics (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Para obtener intensidades de florescencias medias similares (IFM) se ajustaron los voltajes de los fotomultiplicadores (PMT) tomando como referencia la Rainbow Beads (Spherotec, USA). En cuanto al Facs Lyrics se empleó una característica propia de estos equipos para compartir atributos con la finalidad de colocar la población positiva en la misma posición entre los diferentes equipos, esta herramienta es parte del módulo de Configuración y seguimiento de citómetros (CS&T) que permiten la adquisición normalizada de paneles sin necesidad de hacerlo manualmente los voltajes PMT en cada equipo. Se presentaron desafíos para uniformizar FSC/SSC debido a que la colección en FSC de Navios difiere ligeramente de Canto y Lyrics, luego de ajuste en base a linfocitos y se observó que no siempre las poblaciones de mayor tamaño y complejidad coinciden. Concluyendo que las modificaciones en la configuración de estos instrumentos como se detalla en los PNT de EuroFlow™ permite la estandarización

intra e interlaboratorio, aunque podría presentarse dificultades en FSC/SSC por características intrínsecas de cada citómetro de flujo.

Glier H. et al. (2019) [8] La Sociedad Suiza de Citometría desarrolló un proyecto educativo para testear los laboratorios que trabajan bajo los estándares de EuroFlow™, con el objetivo de aumentar la reproducibilidad y comparabilidad entre laboratorios suizos. Se realizaron 2 fases, fase de aprendizaje (Ronda 1) y fase analítica (rondas 2 y 3). Participaron 10 laboratorios en total 6 Facs Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) y 4 Navios (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) cada laboratorio midió una muestra marcada con El tubo Screening para Linfoma de EuroFlow™ (LST), aplicando los protocolos estandarizados, se tomó en cuenta los valores de intensidad de fluorescencia media (MedFI) para marcadores individuales y poblaciones. El coeficiente de variación obtenido para 7 de 11 marcadores fue por debajo del 30%, en la última ronda del estudio el 89% de los participantes obtuvo más del 90% de medFi dentro de los criterios de aceptación, sin embargo, luego del análisis centralizado se identificaron ciertas desviaciones de los procedimientos estandarizados y problemas técnicos. Demostrando de esta manera que la estandarización multiplataforma es factible y permite medFi comparables si se sigue estricatemente protocolos estandarizados.

Flores-Montero J. (2019) [9] Describió los métodos usados para la creación y validación de una base de datos para el kit LST. El programa fue capaz de reconocer el 99.2% (95.5-99.7%) de poblaciones en muestra sanas y 55.6% (rango 1%-98.7%) de muestras patológicas que causaron alarma y requirieron la evaluación de un experto ya sea por desviaciones fenotípicas (62/82; 75.6%) y alteraciones numéricas (71/82;86.6%), cabe destacar que para el 100% de los casos con SLPC el programa evidenció alarmas numéricas. La correlación entre el porcentaje de eventos en alarma y el porcentaje real de células anormales presentes en la muestra luego de la revisión del experto fue de rho=0.76, $p<0.001$, asimismo se encontró buena correlación entre la clasificación y porcentaje de poblaciones normales en automático y el por el método convencional basado en dos expertos independientes

fue (r^2=0.96, p<0.001). Mientras que la correlación entre las células anormales fue de (r^2=0.99, p<0.001). Concluyendo que la identificación automatizada de poblaciones celulares utilizando la base de datos EuroFlow™ LST mediante el Software Infinicyt™ versión 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España) proporciona un herramienta innovadora, confiable y reproducible para el reconocimiento de poblaciones linfocitaria normales y patológicas como contribución en la estandarización de ensayos clínicos de citometría de flujo.

Van der Velden V. (2019) [10] desarrolló y probó los tubos liofilizados EuroFlow™ LST (LST OneFlow) y PIDOT (Cytognos SL), como parte de la estandarización para reducir tiempo y errores operativos durante el procesamiento. Para lo cual evaluó 3 lotes de LST con muestras de sangre periférica, ganglio linfático, y médula ósea de donantes sanos en distintos centros. La comparación entre los reactivos líquidos y el tubo LST liofilizado fueron procesadas bajo protocolos de EuroFlow™. Para el panel de PIDOT se evaluaron 25 muestras de donantes sanos. En la evaluación se observó que en los primeros lotes menor intensidad en CD19PEcy7 y diferencias en la tinción de Inmunoglobulinas, por lo cual se incrementó el tiempo de incubación a 30 min y los lavados pre-marcaje a 3. En el lote 2 se observó mayor tinción de fondo en Pecy7 y FITC y variaciones mayores al 30% para CD56PE y smIgK PE, así que para la siguiente prueba se disminuyó el título de TCRgd-PEcy7 y smIgL FITC se observaron diferencias en FITC y PECy7 al analizar los gráficos se superponen así que no se consideró significativo y se aceptó esta última versión. En la comparación entre formato líquido y seco la mayoría coincidía excepto TCRg/d y smIgK que en el formato liofilizado fue más robusto. En la evaluación de PIDOT se observó mayor variación en CD4 percpcy5.5 y TCRg/d, sin embargo, en el formato liofilizado hubo menos variación para CD4 percpcy5.5 y menor tinción de fondo. Por los cual se concluye que los tubos secos presentan características similares a los reactivos líquidos y pueden mejorar la eficiencia del laboratorio como la calidad de los datos inmunofenotípicos. Los tubos secos otorgan mayor reproducibilidad en la tinción (CV<20%), lo que nos da mayor sensibilidad para detectar los pequeños cambios de niveles de expresión que son de utilidad clínica para el diagnóstico.

L. Lhermitte (2018) [11] propuso la orientación automatizada guiada por una base de datos supervisada por expertos para el diagnóstico y clasificación de leucemias agudas, utilizando el tubo screening de leucemia aguda (ALOT). Para ello se creó una base de datos de referencia con 656 muestras típicas de Leucemia Aguda (145 LLA-T, 377 LLA-B, 134 LMA), procesadas y analizadas mediante protocolos estandarizados. Se evaluaron 783 casos utilizando gráficos basados en análisis de componentes principales (PCA) y algoritmos de clasificación automatizados para la comparación directa de células individuales con la base de datos. Dependiendo de los resultados guiados por la base de datos, los pacientes se clasificaron como: (i) T, B o mieloides típicos (ii) Con un componente de transición a otro linaje; (iii) atípico, (iv) linaje mixto. Los resultados que se obtuvieron fueron comparables con el diagnóstico final de la OMS en mayor al 93% de los casos, incluso, cuando la información de los marcadores en el panel era incompleta. Los resultados mostraron que el análisis guiado por base de datos facilita la interpretación estandarizada de los resultados ALOT y permite una selección precisa de los paneles clasificación relevantes, lo que proporciona una base sólida para diseñar futuras clasificaciones de Leucemia Aguda de la OMS.

Solly et al. (2013) [12] Tomando en cuenta la armonización de instrumentos de una determinada marca en un contexto de escasa información sobre comparaciones más amplias y diversidad de instrumentos, tuvo como objetivo la armonización del citómetro Navios (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), con Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) basando sus experimentos en dos fases. Iniciaron con el ajuste de voltajes de PMT en el instrumento de referencia Canto II, que utilizaron para establecer los valores objetivos en el instrumento de práctica Navios, con lo cual obtuvieron buena correlación con Rainbow beads a excepción de los picos 1 y 2. Luego se usaron leucocitos marcados para la evaluación en 5 diferentes centros. Usando las comparaciones de Bland y Altman para las medianas de fluorescencia se demostró que usando Rainbow Beads o polimorfonucleares teñidos con CD16 ofrecen resultados altamente superponibles. Concluyendo que con estos estudios en dos fases demuestra ser un método viable que permite una sólida armonización. (12). Este estudio proporciona métodos para el ajuste de

voltajes entre citómetros de diferentes fabricantes para obtener resultados reproducibles superando el inconveniente de las escalas y software.

Kalina et al. (2012) [3] planteó la introducción de la citometría de 8 colores, tuvo como objetivo la innovación y estandarización de inmunofenotipificación para el diagnóstico y clasificación de neoplasias hematológicas. Esto requirió la selección de combinaciones óptimas de fluorocromos compatibles con el citómetro y evaluación de procedimientos operativos estándar (SOP) adecuados para la configuración de instrumentos, compensación de fluorescencias y preparación de muestras. Tras 6 años de experimentos colaborativos con diversos centros, concluyó en altos niveles de reproducibilidad basados en la implementación de los SOP de EuroFlow™ y paneles de anticuerpos, esto produjo datos comparables capaces de ser integrados en una sola base de datos. EuroFlow™ proporcionó por primera vez protocolos de laboratorio y herramientas de Software para la inmunofenotipificación por citometría de flujo de 8 colores completamente estandarizada Este estudio aporta el concepto de procedimientos operativos estandarizados y la importancia de los mismos en los procesos de citometría de flujo, base fundamental para la adaptación de todo protocolo de trabajo basado en calidad.

Por lo anteriormente expuesto, en este proyecto se plantea la pregunta:

¿Cuál será la estandarización del citómetro Novocyte Advanteon para el estudio automatizado de linfocitos empleando la base de datos, en un laboratorio privado de lima, 2021?

1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La necesidad de obtener información objetiva y reproducible en los que apoyar la toma de decisiones diagnósticas, es un requisito obligatorio de cualquier prueba incluida la citometría de flujo (5), por ello se requiere adoptar protocolos estándar para el marcaje, adquisición y análisis de datos, siendo necesario implementar procesos estandarizados que permitan resultados comparables, reduzcan la variabilidad subjetividad en el estudio y optimicen los recursos del laboratorio.

A pesar de que a nivel mundial se ha reportado consensos y estrategias para llevar a cabo el estudio por citometría de flujo, la mayoría de las sociedades científicas sólo abarcan una parte del procedimiento, algunos grupos han logrado establecer y promover condiciones que involucren la estandarización de todo el proceso como el grupo Euroflow. Dentro de Latinoamérica muchos laboratorios ya trabajan bajo las recomendaciones EuroFlow™, con óptimos resultados. Todos con el mismo objetivo de lograr niveles de sensibilidad, patrones de expresión uniformes y porcentajes similares.

A nivel nacional existen laboratorios que cuentan con diversas plataformas analíticas por citometría de flujo, siendo la importancia de la investigación brindar evidencias del proceso de marcaje y análisis de acuerdo con recomendaciones estandarizadas para la evaluación automatizada de linfocitos. De esta manera, al emplear equipos e insumos de diferentes marcas, se alcanzan resultados comparables y semejantes. Se considera el presente proyecto como una primera iniciativa en la implementación de protocolos estandarizados para este tipo de citómetros sumado al uso de base de datos, impactará en mejorar la reproducibilidad intra e inter-laboratorio durante periodos prolongados, así mismo reducir la variabilidad y subjetividad en el estudio, estandarizando los procesos que faciliten la emisión de reportes confiables, de calidad y en menor tiempo.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Desarrollar la estandarización del citómetro Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos, utilizando la base de datos, en un laboratorio privado de Lima, 2021.

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar los lisantes y seleccionar el más adecuado en la estandarización del citómetro Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos, en un laboratorio privado de Lima, 2021.
- Determinar los valores objetivos (IFM) empleando material de referencia (perlas Rainbow) en el citómetro Novocyte Advanteon para el estudio automatizado de linfocitos, empleando la base de datos EuroFlow™, en un laboratorio privado de Lima, 2021.
- Evaluar el porcentaje de poblaciones identificadas de Novocyte Advanteon con la base de datos Infinicyt™ versión 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España) para el estudio automatizado de linfocitos, en un laboratorio privado de Lima, 2021.

1.4 BASES TEÓRICAS

1.4.1 BASE TEÓRICA

El citómetro de flujo es un instrumento usado para la medición de partículas en suspensión, que fluyen en una sola fila iluminada por un láser. Durante el paso de estas partículas por el láser se proporciona información de dispersión de luz (tamaño y complejidad) y emisión de fluorescencia que es transformada digitalmente y almacenada en un sistema informático.

Dentro de los componentes principales del citómetro de flujo podemos identificar los siguientes: sistema fluídico, sistema óptico, sistema electrónico y sistema informático, cada una cumple una función específica para el análisis de datos.

Las células marcadas con anticuerpos conjugadas a fluorocromos comienzan su viaje cuando la muestra se aspira y se transporta a través de la tubería a una celda de flujo. En la celda de flujo la muestra se introduce en el centro de un fluido portador que fluye más rápido y hace que las células pasen en fila frente a la fuente de luz para su excitación. La dispersión de luz y sus fluorescencias se capturan espectralmente por los filtros ópticos y dirigido a fotodetectores apropiados para su conversión a señales eléctricas. (13) Los fotosensores y la electrónica crean señales que son proporcionales a las características de la célula. La recopilación de datos informáticos y el análisis de datos de Software realizan análisis estadístico y muestran las propiedades de cada población. (14)

- **CALIBRACIÓN Y MATERIALES DE REFERENCIA**

a. Partículas de referencia en citometría de flujo

El uso de estándares y controles ayuda a garantizar que el instrumento funcione correctamente y que los datos obtenidos sean reproducibles y confiables. Actualmente, las partículas de referencia más usadas son las perlas “beads” utilizados para calibrar, controlar, compensar y cuantificar; sin embargo, algunos protocolos contemplan el empleo de células, aunque se han observado algunas desventajas como variabilidad biológica que puede significar diferencias en las

intensidades de fluorescencia, así como reducida vida media. Las células aún se siguen usando en algunos protocolos como controles de compensación y para el ajuste de voltajes para FSC y SSC.

b. Perlas *"Beads"*

Las perlas son los materiales más comunes utilizados para calibrar, controlar, estandarizar y cuantificar empleados en citometría de flujo. Podemos encontrar los siguientes tipos de perlas:

Perlas de recuento:

Las perlas de recuento son un método sencillo para determinar el conteo absoluto de células en una muestra, el fabricante suministra una concentración de perlas/volumen conocido y mediante un cálculo por proporciones se determina el número de células. Sin embargo, ya existen en el mercado citómetros volumétricos en los que ya no es necesario el uso de perlas.

Perlas de control de calidad:

El uso de perlas para el control de calidad minimiza la variación en la alineación entre citómetros, hace posible la calibración, compensación y control diario del citómetro. Las perlas permiten la estandarización y calibración de equipos que no tienen necesariamente los mismos filtros de emisión y/o longitudes de onda de excitación. (15) Permitiendo de esta manera realizar estudios confiables en el tiempo y garantizando coherencia entre múltiples instrumentos y laboratorios.

La clasificación de perlas de acuerdo con las características y funciones específicas es la siguiente:

Las perlas de Tipo I (estándares de alineación), perlas de tipo II (estándares de referencia) y tipo III (patrones de calibración). Las perlas de tipo I son utilizadas para la alineación óptica del citómetro, las perlas de tipo II poseen una determinada intensidad de fluorescencia que se usan para la configuración del equipo. Las partículas de calibración (tipo III) abarcan múltiples poblaciones empleadas para calibrar la respuesta del equipo y cuantificar las señales de fluorescencia de las muestras. Las perlas de tipo II y III a su vez se subdividen

en categorías de acuerdo a sus características espectrales: Tipo A: fluorocromos con amplios espectros capaces de excitarse con una amplia gama de longitudes de onda, Tipo B: unidos a un fluorocromo particular con emisión similar a una célula marcada, Tipo C: Perlas sin fluorescencia a los que hay que agregarle el fluorocromo y proporcionará mejor coincidencia espectral, (16) dentro de esta última categoría se ubican las perlas de compensación. De acuerdo con esta clasificación las perlas Eight-peak Rainbow bead calibration particles (Spherotec, Lake Forest, IL) empleadas en la estandarización EuroFlow™ corresponden al tipo IIIA.

c. Calibración

Para la calibración del instrumento se emplea una mezcla de perlas estables de diferentes niveles de intensidad con valor conocido como por ejemplo Rainbow Beads 8 peaks, se realiza el ajuste de voltajes de PMT tomando en cuenta los valores objetivo-suministrados por el fabricante.

No es necesario que la calibración sea una práctica diaria, sin embargo, la calidad del instrumento debe monitorearse diariamente este proceso asegura que el instrumento todavía se encuentre calibrado si las mediciones no exceden los límites establecidos por el fabricante. Si los controles están fuera de rango o el citómetro ha sido reparado será necesario recalibrar.

▪ FLUOROCROMOS Y COMPENSACIÓN

a. Fluorocromos

Para determinar las propiedades químicas de las células es necesario el uso de anticuerpos marcados con fluorocromos. Los fluorocromos son excitados a una longitud de onda determinada (longitud de onda de excitación), absorben luz acumulando energía, para regresar a su estado basal liberan esta energía en forma de fotones a una longitud de onda mayor (longitud de onda de emisión) produciendo fluorescencia.

Conocer el espectro de excitación y emisión de los fluorocromos es importante para el armado de paneles y elección del instrumento, ya que la excitación de los fluorocromos depende de los láseres de equipo y el rango de emisión de los filtros

de paso de banda que están delante de los fotomultiplicadores. Los fluorocromos más usados en los paneles para neoplasias hematológicas e inmunodeficiencias se describen en la tabla 1

Láser	Fluorocromo	Abreviatura	Excitación máx.	Emisión máx.	Filtro
AZUL	Isotiocianato de fluoresceina	FITC	490	525	530/30
	Ficoeritrina	PE	496	578	575/26
	Proteína Peridina Clorofila Cianina 5	PERCP cy5.5	490	695	695/40
	Ficoeritrina cy7	PECy7	496	785	780/60
ROJO	Aloficocianina	APC	650	660	660/20
	Aloficocianina cy7/H7	APCcy7	650	785	780/60
VIOLETA	Pacific Blue	PB	401	452	450/50
	Pacific Orange	PO	400	551	530/30-572/28
	Brillant Violet 421	BV421	407	421	450/50
	Brillant Violet 510	BV510	405	510	510/50

Tabla 1: Longitudes de onda de excitación y emisión máximas para fluorocromos. (Tomado de Biolegend)(17)

b. Compensación

La emisión de fluorocromos usados de manera simultánea puede superponerse en el rango deseado y, por tanto, influir en el detector diseñado para un fluorocromo distinto. Para un análisis objetivo de datos este fenómeno debe ser corregido, a esta corrección se denomina compensación. Generalmente, es realizado de manera automática por el software de adquisición del fabricante de equipo, mediante la adquisición de controles de compensación y luego optimizado por el usuario. Esta etapa se hace más difícil a medida que los paneles son más amplios por lo cual los softwares que calculan automáticamente la matriz de compensación son herramientas de mucha utilidad.

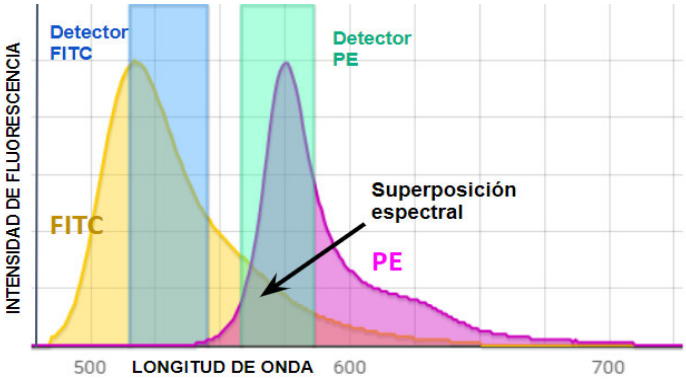


Gráfico 1: Superposición de las longitudes de onda de PE y FITC.

Las longitudes de onda de FITC se superponen y son captados por el detector de PE, es necesario aplicar compensación entre ambos fluorocromos para tener lecturas correctas. (Tomado de https://www.biolegend.com/)

- **INSTRUMENTACIÓN**

Con el paso de los años los citómetros de flujo son dispositivos cada vez más sofisticados, con velocidades de adquisición mucho más rápidas, este avance se vio favorecido por el desarrollo de otros sectores como telecomunicaciones y semiconductores proporcionando mayor precisión y fiabilidad con una importante reducción de tamaño. (13)

Actualmente, existen diversos fabricantes de citómetros digitales cada uno con sus propias características, con mayor capacidad de detección que dan la posibilidad de paneles muchos más extensos, mayor resolución. Así también se observa el surgimiento de otros tipos de citometría diferentes a la convencional como citometría espectral, citometría de masas, citometría computacional y citometría de imágenes.

- **ESTANDARIZACIÓN EN CITOMETRÍA DE FLUJO**

El término de estandarización se usa para describir el conjunto completo de pasos metódicos, destinado a mejorar la reproducibilidad de los resultados de citometría de flujo en el laboratorio durante un proceso prolongado de tiempo en diferentes áreas geográficas y en diferentes instrumentos. (1)

Una de las finalidades de los laboratorios de citometría de flujo es realizar pruebas estandarizadas precisas, altamente sensibles, en el menor tiempo posible, para el diagnóstico y clasificación pronostica de enfermedades hematológicas, así como también en la evaluación de la efectividad del tratamiento. Para lograrlo, es necesario introducir técnicas que mejoren los procesos, aplicando las herramientas que nos brinda el desarrollo de las tecnologías en estas áreas, de la mano con la evaluación de la calidad de los procesos y productos. En este sentido, uniformizar los datos obtenidos mediante adquisiciones de citometría de flujo, con protocolos estandarizados que permitan dar respaldo al trabajo, así como facilitar el seguimiento, a través de los procesos algorítmicos es uno de los pasos a seguir en el plan de mejora continua de los laboratorios.

La adaptación de un instrumento de citometría de flujo para protocolos de análisis de leucocitos, partiendo de un procedimiento estandarizado, requiere de pasos como: definición de voltajes de fotomultiplicadores, utilizando perlas fluorescentes que brinden información estándar en los diferentes canales que permitan conseguir resultados similares, según los del citómetro patrón escogido; elección del material lisante que permita lograr datos homólogos al procedimiento estándar; evaluación de la homologación de datos y resultados, haciendo uso de las herramientas y estadísticas utilizadas en el procedimiento estándar, como la base de datos.

A lo largo del tiempo diversos grupos científicos relacionados han presentado diferentes propuestas algunos han abarcado todo el proceso y otro parte de él.

a. Propuesta EuroFlow™

En el año 2012 el grupo EuroFlow™ público la propuesta de una estandarización multicéntrica para el estudio de Inmunofenotipo para el estudio de Neoplasias hematológicas el cual está compuesto por guías y recomendaciones de ajustes estandarizados de equipos, inicialmente fue propuesto para tres citómetros, tomando como instrumento patrón a Facs Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) a través de los años fueron sumándose otros instrumentos de diferentes fabricantes. Otra parte importante de la estandarización sugerida por EuroFlow™ fue la recomendación de paneles y reactivos, así como protocolos estandarizados

para obtener archivos similares en diferentes centros y a través del tiempo, con lo cual se pudo armar una base de datos estandarizada para el análisis automatizado.

Dentro de los aspectos que tomaron para realizar el ajuste estandarizado del instrumento fue el ajuste a través de perlas fluorescentes Rainbow Beads, (Spherotec, Lake Forest, IL). Se tomó como referencia el octavo pico y se estableció valores target, los cuales se usaron luego para ajustar otros equipos y obtener resultados reproducibles en el estudio multicéntrico que se ejecutó posteriormente. Luego de un tiempo se estableció el séptimo pico como referencia, ya que en algunos citómetros el octavo pico estaba fuera de la escala. Por tanto, para lograr la estandarización completa EuroFlow™ estableció procedimiento operativo estándar de ajuste de instrumentos, compensación, paneles de anticuerpos, protocolos de tinción y procesamiento de muestras; finalmente una base de datos con casos modelos pre cargados que a través de la comparación por el Software Infnicyt™ versión 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España) pueden reconocer automáticamente la población y proporcionar información objetiva acerca del diagnóstico de neoplasias hematológicas e inmunodeficiencias, dejando de lado la subjetividad del analista cuando se realiza de manera manual.(3)

b. Configuración óptica de instrumentos estandarizados

De acuerdo con los criterios EuroFlow™ los instrumentos deben cumplir ciertas características como tener detectores independientes, ser IVD, contar con tres láseres 405 nm, 488 nm y 633-640 nm (tabla 3) y al menos poseer los filtros necesarios para detectar los fluorocromos recomendados por EuroFlow™. Los equipos que ya fueron estandarizados según diversas publicaciones son los que aparecen en la tabla 2.

Láser	Fluorescencias	FACS CANTO II	NAVIOS	Omnicyt	MACS QUANT	Facs Lyrics BD
violeta (405 nm)	PB/V450/BV421	450/50	450/50	440/50	450/50	448/45
	PO,OC515, V500	510/50	550/40	512/25	525/50	528/45
azul (488nm)	FITC	530/30	525/40	530/30	525/50	527/32
	PE	585/42	570/30	574/26	585/40	586/42
	PERCPCY5.5	670LP	695/30	695/40	655-730	700/54
	PECY7	780/60	755LP	780/60	750 LP	755LP
rojo (633, 638,640 nm)	APC	660/20	660/20	670/14	655-730	660/20
	APCCY7, APCC750, APCH7	780/60	755LP	780/60	750LP	755LP

Tabla 2: Configuración óptica de los equipos en los que se logró la estandarización EuroFlow™. (Adaptado de Novákova, 2019)(4)

	FACS CANTO II	NAVIOS	Omnicyt	MACS QUANT
AZUL	488	488	488	488
ROJO	633	638	638	640
VIOLETA	405	405	405	405

Tabla 3: Configuración de láseres de los equipos en los que se logró la estandarización EuroFlow™. (Adaptado de Novákova, 2019)(4)

c. Configuración óptica Novocyte Advanteon (Angilent)

El Novocyte Advanteon es un equipo IVD que puede adaptarse a diversos ensayos de citometría y ofrece flexibilidad de 1,2 o 3 opciones de láser que ofrece hasta 21 canales de fluorescencia. Tomando en cuenta los requerimientos de EuroFlow™ la opción que mejor se adapta es la configuración V8B7R4 que proporciona tres láseres: Azul (488nm), Rojo (640nm) y violeta (405nm), con una capacidad de detección de hasta 19 canales de fluorescencia (Tabla 4) y 21 parámetros detectables. (18)

Para efectos de experimentos de acuerdo con las recomendaciones de Grupo EuroFlow™ usaremos los tres láseres: violeta (405nm), azul (488nm) y rojo (640nm). Con dos detectores para el láser violeta Pacific Blue con filtro 455/45 y Pacific Orange con filtro (530/30) o (572/28) se definirá el filtro que otorgué mejores resultados. Para el láser azul se emplearán 4 detectores FITC filtro (530/30), PE (filtro 572/28), Percp cy5.5 filtro (695/40), PEcy7 filtro (780/60) y finalmente para el láser rojo serán dos detectores APC filtro (667/30) y APCCy7 (780/60).

Novocyte Advanteon		
Violeta (488nm)	Pacific Blue	445/45
	Pacific Orange	572/28 o 530/30
Azul (640nm)	FITC	530/30
	PE	572/28
	PERCPCY5.5	695/40
	PECY7	780/60
Rojo (405 nm)	APC	667/30
	APCCY7	780/60

Tabla 4: Fluorocromos propuestos por EuroFlow™ que pueden ser leídos en Novocyte Advanteon. *(Adaptado de Guía de Operador Novocyte Advanteon)* (18)

d. Protocolos de ajustes de voltajes y compensación

El rendimiento de los citómetros puede variar de uno a otro, para evitar estos inconvenientes es importante la optimización y estandarización adecuada, para garantizar resultados consistentes y confiables, reproducibles a lo largo del tiempo y en múltiples instrumentos.

Para realizar este proceso se pueden usar perlas fluorescentes de referencia específicas, en el cual se define un rango para las señales de cada detector, los pasos generales para la estandarización son: (19)

1. Establecer valores target (IFM) en el instrumento de referencia mediante perlas.
2. Optimizando valores objetivos en el instrumento de referencia mediante células
3. Aplicar los valores target en otros instrumentos mediante las perlas de referencia.

e. Paneles estandarizados

Dentro de la estandarización es necesario el uso de paneles establecidos. EuroFlow™ recomienda paneles, marcas, clonas, flurorocromos y volúmenes determinados. (20). Dicha combinación de anticuerpos es utilizada rutinariamente en el laboratorio, agregando individualmente cada anticuerpo del panel, lo cual podría conducir a errores en el proceso (1-4%) con paneles más complejos; además del incremento del tiempo requerido. La propuesta de tubos liofilizados puede proporcionar menor variabilidad de tinción entre muestras, así como estabilidad prolongada y generar datos más sólidos. (10) Por lo tanto, la eficiencia y calidad del laboratorio puede mejorarse mediante el uso de reactivos listos para usar en un formato de tubo de ensayo único seco. (21)

f. Procesamiento de las muestras para Inmunofenotipo

Para garantizar resultados reproducibles otros de los puntos críticos son los protocolos de preparación de muestras y lisado de eritrocitos. Habitualmente un protocolo de preparación de muestra para citometría de flujo (marcaje) incluye la incubación de la muestra con los anticuerpos marcados con fluorocromos, lisado de

hematíes/fijación y lavado; aunque también existen protocolos sin lavado que son usados frecuentemente en los recuentos celulares. En condiciones óptimas cualquier protocolo de citometría de flujo debe alcanzar los objetivos del estudio, debe considerarse costos y tiempos de procesamiento además cumplir las siguientes características:

I. Mantener una adecuada resolución entre las poblaciones mayoritarias de la muestra de acuerdo con sus parámetros de dispersión de luz.
II. Minimizar la pérdida celular.
III. Preservar al máximo la estabilidad de los epítopos antigénicos e intensidad de fluorescencia
IV. Mantener bajos niveles de autoflorescencia y debris. (22)

Los pasos del procesamiento deben estar establecidos en procedimientos operativos estándar además de educar al personal a ceñirse a los protocolos, ya que el incumplimiento puede generar variabilidad en la estandarización.

El lisado de los glóbulos rojos se realiza mediante lisis osmótica después del marcaje para retirar las poblaciones que no son de interés en el estudio. (23) En el mercado existen diversas opciones de lisante, sin embargo, dependiendo de la solución de lisis se pueden observar diferentes cambios en las características físicas de las células y con frecuencia en los patrones de marcaje, al menos de algunos marcadores. (24)

Para evitar este sesgo en el presente estudio se utilizarán kits comerciales de paneles estandarizados y se seguirá estrictamente los protocolos establecidos en los SOPs de EuroFlow™.

- **AUTOMATIZACIÓN**

La automatización en los procesos de laboratorio aumenta el rendimiento y minimiza las fuentes de error en los procesos manuales de rutina, la citometría de flujo no es ajena a ella. Actualmente, diversos grupos científicos trabajan en este fin, algunos ejemplos son el uso de carruseles en la adquisición de muestras. Otros procesos que se están automatizando son la autocalibración y monitoreo diario del equipo, procedimientos de puesta en marcha y apagado, mantenimientos

preventivos, lavados y compensación de fluorescencias. (14) Respecto al análisis existen algunas propuestas como el análisis automatizado mediante compuertas automáticas y otras basadas en base de datos.

a. Análisis Automatizado

La base de datos del Software Infinicyt™ versión 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España) es una herramienta revisada y cargada con poblaciones celulares normales, reactivas y aberrantes revisadas por expertos del consorcio EuroFlow™, la cual a través de una adquisición en formato FCS 3.0 agrupa las poblaciones y compara el elemento ingresado con los casos que ya fueron cargados previamente, los elementos idénticos son identificados automáticamente y categorizados dentro de la población celular correspondiente, los "clusters" que no son idénticos se les asigna en poblaciones en *check*, el usuario debe analizarlos manualmente decidir si son normales o aberrantes y agruparlos en alguna categoría del árbol de poblaciones, una vez terminado el proceso en programa nos proporciona automáticamente el Informe de Citometría de Flujo. (11)

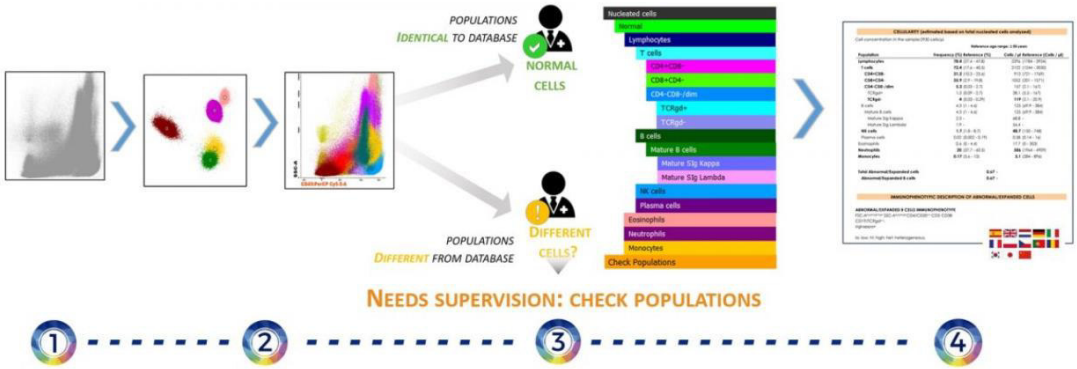


Gráfico 2: Algoritmo de identificación de la base de datos. (Tomado de https://www.cytognos.com/)

b. Construcción de la base de datos

El software Infinicyt™ versión 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España) ha sido construido a partir de muestras normales, procesadas bajo los protocolos establecidos en los SOP de EuroFlow™. Se inició con la selección de muestras a

incluir de acuerdo con las similitudes de las poblaciones, intensidades de fluorescencia media (IFM); dejando de lado los archivos con errores técnicos en procesamiento, adquisición o compensación. Continuaron con la evaluación de archivos de referencia y validación de la base de datos frente a muestras normales y patológicas. Para definir un grupo "cluster" se identificó un número mínimo mayor o igual a 10 eventos por grupo (9), se etiquetaban estas poblaciones como identificadas si se encuentran dentro de las 2.5 desviaciones estándar. Las poblaciones con diferencias fenotípicas o numéricas son etiquetadas como poblaciones en chek para la revisión de un experto.

- **ANÁLISIS DE LINFOCITOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

Los linfocitos son células mononucleares que forman parte de los leucocitos y forman parte del sistema inmunitario adaptativo, son producidos en médula ósea y completan su diferenciación en los diferentes órganos linfoides primarios y secundarios. (25)

Los linfocitos están conformados por distintas subpoblaciones que tiene múltiples funciones, pero son muy similares morfológicamente, (26) por esta razón se necesitan métodos altamente sensibles y específicos para su estudio diferencial, en este sentido la citometría de flujo representa la alternativa de elección.

El desarrollo de los anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos permite el reconocimiento y caracterización de las distintas subpoblaciones, mediante técnicas muy sensibles y precisas como la citometría de flujo. Los linfocitos humanos pueden clasificarse en tres poblaciones principales según sus funciones y expresión antigénica: linfocitos B, linfocitos T, linfocitos NK.

Dentro de las pruebas más realizadas para el estudio de linfocitos por citometría de flujo son los recuentos de subpoblaciones linfocitarias T, B, NK, inmunodeficiencias y recuento de linfocitos CD4/CD8, ambos con utilidad clínica para el monitoreo de sistema inmune y seguimiento de VIH respectivamente. Adicionalmente dentro del campo hematoncológico se estudian las subpoblaciones

y alteraciones en la expresión de marcadores (inmunofenotipo) para el diagnóstico de enfermedades que afecten las líneas linfocitarias como los Síndromes Linfoproliferativos Crónicos (SLPC).

a. Kits estandarizados para el estudio de linfocitos

Los kits comerciales son combinaciones de anticuerpos liofilizados, listos para resuspender y usar, los beneficios son que disminuyen los errores (por ejemplo: agregar anticuerpos errados o no agregar algún fluorocromo), además de proporcionar marcajes reproducibles, ya que disminuyen las diferencias en los índices de tinción entre lotes. En el mercado existen diferentes presentaciones de los paneles para el estudio de poblaciones linfoides se encuentran LST, PIDOT (Cytognos SL, Salamanca, España), BD One Flow LST (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) (10) y otras propuestas que no son paneles EuroFlow™ como ClearLab10c (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). (27)

b. Kit LST *"Lymphoid Screening tube":* Tubo de detección linfoide

Es un tubo de 8 colores que contiene una mezcla de 12 anticuerpos en formato liofilizado diseñado para la detección de poblaciones linfoides maduras aberrantes de línea B, T y NK. (28) Puede utilizarse para evaluar sospechas de linfoma por la presencia de linfocitosis, ganglios incrementados, esplenomegalia, componentes monoclonales en suero, citopenias sin causa aparente. (23)

Está compuesto por los anticuerpos: CD45, CD3, CD56, CD4, CD8, CD56, CD19, TCR g/d, CD38 y cadenas sIgK y sIgL mostrados en la tabla 5; presentes en diferentes subpoblaciones de linfocitos y células plasmáticas que pueden ser reconocidos usando citometría de flujo, (28) estos estudios son ampliamente utilizados para la caracterización de diferentes enfermedades hematológicas, la detección de linfocitos maduros clonales fenotípicamente aberrantes tiene un papel relevante en el diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos crónicos.(31)

Fluorocromo	Pacific Blue™		OC515™	FITC		PE		PerCP-Cyanine5.5	PE-Cyanine7		APC	APC-750™
Marcador	CD20	CD4	CD45	CD8	SmIgλ	CD56	SmIgK	CD5	CD19	TCRγδ	SmCD3	CD38
Clon	2H7	RPA-T4	GA90	UCHT-4	Policlonal	C5.9	Policlonal	L17F12	SA287	11F2	UCHT-1	LD38
Isotipo	IgG2b	IgG1	IgG2a	IgG2a		IgG2b		IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Reactividad	Cél. B	Cél. T colab.	Leucocitos	Cél. T citotox.	Cadena Ligera Ig Lambda	Cél. NK	Cadena Ligera Ig Kappa	Cél. T	Cél. B	Cél. T	Cél. T maduras	Cél. Plasmáticas y otras

Tabla 5: Anticuerpos del Kit LST (Inserto KIT LST Cytognos SL, Salamanca, España)(28)

El algoritmo para identificar manualmente las poblaciones en el tubo LST es el descrito en el artículo que detalla el procedimiento para la construcción de la base de datos para LST.

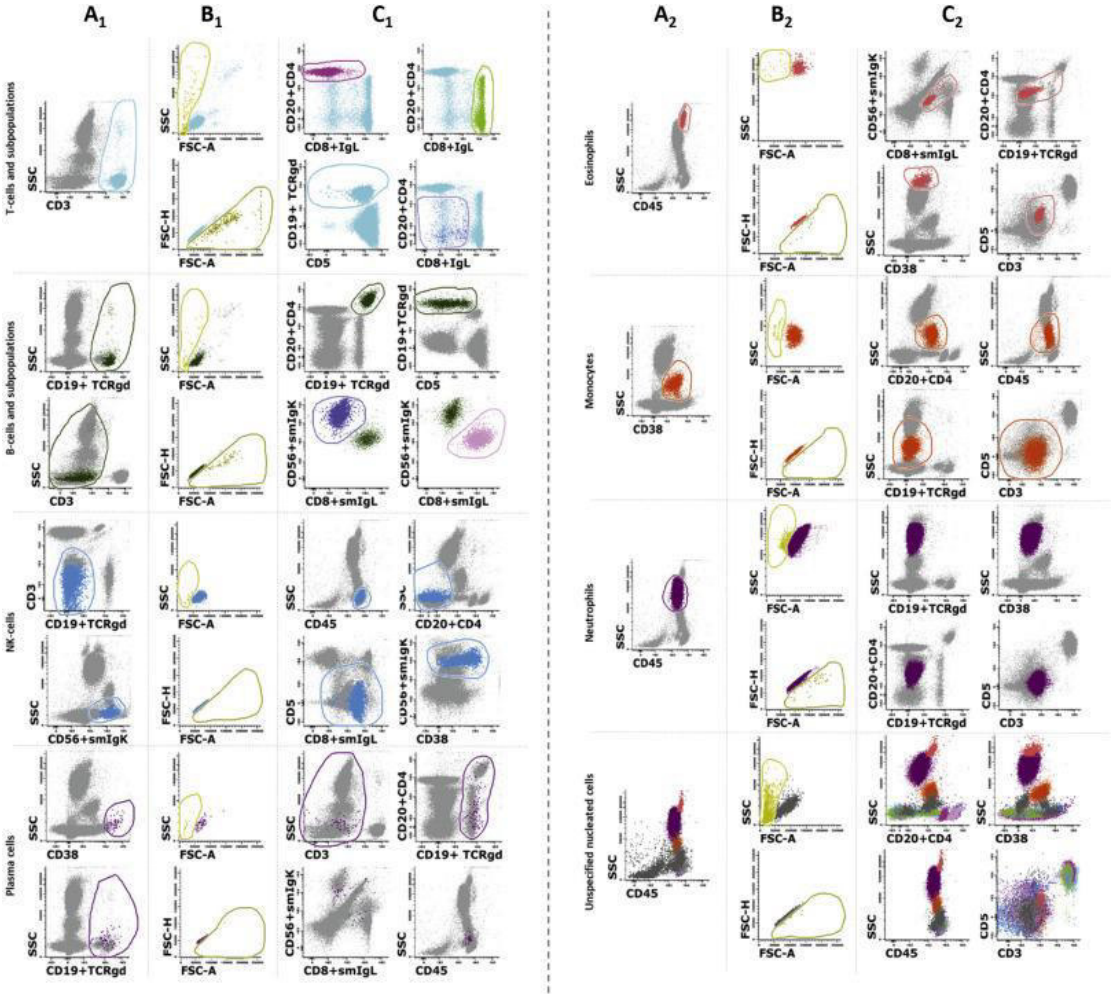


Gráfico 3: Algoritmo usado para el reconocimiento de las poblaciones reactivas/normales LST (9) **células nucleadas no especificadas incluye basófilos y células dendríticas para los que no existen marcadores específicos en este panel.* (Tomado de Flores J. et al,2019) (9)

Población celular	Principales características fenotípicas
Células B maduras	SSC ^{lo} , FSC ^{lo} , CD45 $^{+}$, CD19 $^{+}$, CD20 $^{+}$, CD3 $^{-}$
smIgκ	smIgκ $^{+}$, smIgλ $^{-}$
smIgλ	smIgλ $^{+}$, smIgκ $^{-}$
Células T	SSC ^{lo} , FSC ^{lo} , CD45 $^{+}$, CD3 $^{+}$, CD19 $^{-}$
CD4	CD4 $^{+}$, CD8 $^{-}$
CD8	CD8 $^{+}$, CD4 $^{-}$
TCRγδ	CD4 $^{-}$, CD8 $^{-}$, TCRγδ $^{+}$
TCRγδ $^{-}$ (CD4 $^{-}$, CD8 $^{-}$)	CD4 $^{-}$, CD8 $^{-}$, TCRγδ $^{-}$
Células NK	SSC ^{lo}, FSC ^{lo}, CD45 $^{+}$, CD19 $^{-}$, CD20 $^{-}$, CD3 $^{-}$, CD56 $^{lo/+}$
Células plasmáticas circulantes	SSC ^{int}, FSC ^{int}, CD38 ^{hi}, CD45 $^{-/lo}$, CD19 $^{+}$
Eosinófilos	SSC ^{hi}, FSC ^{Int}, CD45 ^{hi}, otros marcadores $^{-}$ (autofluorescente en algunos canales)
Neutrófilos	SSC $^{int/hi}$, FSC $^{int/hi}$, CD45 $^{+}$, otros marcadores $^{-}$
Monocitos	SSC ^{int}, FSC ^{int}, CD45 $^{+}$, CD4 $^{+}$, CD38 $^{+}$
Células nucleadas no especificadas	Propiedades de dispersión de luz compatibles con leucocitos y ≥ 1 marcador positivo en la combinación, pero no categorizadas como población celular única y distinta

SSC, dispersión de luz lateral; FSC, dispersión de luz hacia adelante; sm, membrana superficial; Ig, inmunoglobulina; TCR, receptor de células T; lo, bajo; int, intermedio; Hi: alto.

Tabla 6: Descripción fenotípica de las poblaciones identificadas en LST. (Tomado de Flores J. et al,2019) (9)

1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

Análisis automatizado: Análisis mediante programas automáticos con asistencia humana mínima.

Base de datos EuroFlow™: Base de datos generada y validada por Euroflow™ con archivos de muestras normales procesadas y adquiridas siguiendo los protocolos operativos estándar de EuroFlow™. Estas bases de datos están incluidas en el software Infinicyt™ versión 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España), de tal forma que, al ingresar un caso nuevo, el programa realizará la comparación, identificará las poblaciones y generará el informe.

Bits: Es un dígito de sistema binario, es la unidad mínima de información empleada en informática en cualquier dispositivo digital. A mayor capacidad de bits de un instrumento se traduce en mayor resolución para el usuario.

Coeficiente de variación (CV): Propiedad adimensional que mide una distribución de población.

Compensación: Factor de corrección aplicado para permitir la superposición espectral.

Escalas: Escala arbitraria que representa el aumento de intensidad de la señal, existen tres tipos de representaciones: escala lineal, logarítmica y biexponencial.

Estandarización: Proceso e implementación y desarrollo de estándares técnicos basados en consensos.

Formato FCS: Formato estándar de citometría de flujo para archivos de datos. El estándar es publicado por la sociedad internacional de citología analítica. FSC 3.0 es el más usado y puede ser leído por Software de diferentes fabricantes.

FSC: Dispersión frontal, nos proporciona información de tamaño.

IFM: Índice de Fluorescencia media, promedio de intensidad de fluorescencia.

Kit LST: "Lymphoid Screening Tube" kit de detección de 8 colores y 12 anticuerpos para el estudio de linfocitos, con el objetivo de detectar poblaciones fenotípicamente aberrantes B, T y NK maduras.

Lisante: Solución cuya función es lisar hematíes que no son de interés en el estudio SSC: Dispersión lateral, nos proporciona información de complejidad interna.

Material de referencia: Material suficientemente homogéneo y estable con respecto a las propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición.

SOPs: Procedimientos operativos estandarizados.

Voltaje: Controla la amplitud de la señal óptica necesaria para activar un tubo fotomultiplicador. El aumento de voltaje disminuye la señal necesaria para activar un tubo fotomultiplicador.

1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

La estandarización del citómetro de flujo Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos en un laboratorio privado de Lima 2021, presenta resultados comparables a los obtenidos siguiendo las recomendaciones de la estandarización EuroFlow™.

CAPITULO II: MÉTODOS

2.1 DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El enfoque del estudio es cuantitativo pues las variables se analizaron estadísticamente a través de sus datos numéricos obtenidos de cada experimento. El alcance es exploratorio pues no hay registro de estandarización en instrumentos de este fabricante.

2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Estudio cuasiexperimental debido a que la elección de sujetos se ejecutó sin aleatorización. Por las características de la recolección de datos es prospectivo y de corte transversal.

2.1.3 POBLACIÓN

No aplica una población de estudio, pues se utilizarán materiales de referencia requeridos en los protocolos de estandarización (perlas autofluorescentes y muestras de sangre periférica obtenidas por punción venosa en tubos con EDTA).

2.1.4 MUESTRA Y MUESTREO

Para el protocolo de selección de lisantes se usaron 10 muestras de sangre periférica en EDTA K3 de donantes voluntarios sanos (SP-DVS) del laboratorio Cytometric procesadas dentro de las 24 horas post toma de muestra. El muestreo para los donantes de sangre periférica fue no probabilístico de tipo incidental.

En el protocolo de voltajes se emplearon 3 muestras frescas de sangre periférica en EDTA K3 de SP-DVS del laboratorio Cytometric, en tres fechas diferentes una por día. Para la selección de valores objetivos se emplearon perlas fluorescentes Rainbow Beads 8 peak Lote EAM01 (Spherotec, Lakeforest, IL).

En cuanto a la verificación de la aceptabilidad de los resultados se emplearon 25 muestras tomadas en tubos de EDTA K3 de SP-DVS adicionales del laboratorio Cytometric, procesadas dentro de las 24 horas post toma de muestras.

2.1.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Muestras de sangre periférica anticoaguladas con EDTA de donantes voluntarios sin antecedentes de linfomas o inmunodeficiencias.

- Muestras de SP procesadas y adquiridas dentro de las 24 horas post extracción.
- Muestras procesadas bajo las recomendaciones del fabricante.
- Muestras marcadas con el kit LST de Cytognos (Cytognos SL, Salamanca, España) y procesadas bajo las recomendaciones de EuroFlow™.
- Muestras adquiridas con los ajustes propuestos en Novocyte Advanteon.

2.1.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Muestras adquiridas con voltajes diferentes a los establecidos
- Muestras con menos de 50 000 eventos CD45 positivos
- Muestras con problemas técnicos en el procesamiento.
- Muestras con celularidad viable menor al 50%

2.1.5 VARIABLES

VARIABLE: Estandarización del citómetro Novocyte Advanteon para la identificación automatizada de linfocitos.

Expresado por:

- Selección de lisantes
- Ajuste de voltajes y determinar valores objetivos
- Evaluación de la estandarización con la base de datos

2.1.6 TÉCNICAS E INTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La técnica empleada fue: protocolos experimentales para la estandarización del citómetro.

Se presentó la idea del proyecto al laboratorio Cytometric Bioservices y reuslto de su interés para la estandarización de su equipo Novocyte Advateon bajo los estándares de EuroFlow™, otorgándose los permisos respectivos mediante una solicitud (anexo 4) y estableciendo un convenio entre instituciones con el laboratorio Biolab para el uso de equipo patrón e instalaciones.

Los experimentos realizados fueron los siguientes:

i. Elección de lisantes

La solución lisante cumple un papel importante en la estandarización, por lo cual es necesario encontrar una alternativa con buen rendimiento y de trazados similares en los parámetros de dispersión FSC y SSC a los obtenidos con el lisante patrón (Facs Lysing). Para este fin se evaluarán el lisante patrón frente a tres diferentes soluciones de lisis:

- Facs Lysing (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
- Optylise C (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
- Excellyse I (Exbio, Praga, República Checa)
- Excellyse Easy (Exbio, Praga, República Checa)

Se marcaron 10 muestras de sangre periférica de donantes voluntarios sanos con un cóctel de monoclonales (Exbio, Praga, República Checa) se incubaron por 30 minutos y se lisaron con las diferentes soluciones lisantes en evaluación bajo los procedimientos descritos en los Anexos (7,9,10,11) de acuerdo con las recomendaciones de cada fabricante. Para el lisante patrón se usó el procedimiento descrito en SOP marcaje para antígenos de superficie, disponible en www.Euroflow.org. Todos los lisantes involucraron marcaje de antígenos de superficie es decir marcar, lisar y lavar para retirar restos celulares lisados.

Previa a la adquisición de muestras se realizó el mantenimiento diario de ambos equipos que consiste en lavados y eliminación de burbujas, luego se corrió las perlas de control diario del equipo, CST en el caso de instrumento patrón y QC en Novocyte Advanteon, una vez aprobado este procedimiento. Se continuó con la adquisición de muestras las muestras lisadas con Facs Lysing la mitad se corrieron en el instrumento patrón, mientras que lo restante y los procesados con los lisantes en evaluación fueron adquiridos en Novocyte Advanteon.

Los criterios evaluados fueron los siguientes:

- Menor pérdida celular y alteración en las proporciones poblacionales.

Se evaluó la pérdida celular durante el procesamiento usando muestras de valor leucocitario conocido, ya que las muestras fueron leídas por un equipo

hematológico. Para calcular la pérdida celular durante la prueba de lisantes, se usará el programa de adquisición NovoExpress FSC (Agilent), se calcularán los valores absolutos mediante metodología volumétrica bajo el reconocimiento de leucocitos totales con CD45, se obtendrán los porcentajes de cada población celular por lisante y serán ingresados en la ficha de recolección de datos.

- Menor alteración en los índices de fluorescencia media y CV en comparación con el lisante patrón

Para identificar la afectación en los índices de fluorescencia, se evaluaron las medias de las poblaciones positivas por cada lisante, así como el coeficiente de variación (CV) de los parámetros leucocitarios descritas en la tabla 7 y serán comparados con el lisante patrón. Fueron exportados directamente del programa Infinicyt™ versión 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España) en formato Microsoft Excel 2019 y posteriormente ingresados en la base de datos.

Célula	**Fluorocromo**	**Características fenotípicas**
Neutrófilos	FITC	SSC alto, CD16 + fuerte
Linfocitos NK	PE	SSC bajo, CD3-/CD56+
Linfocitos T CD4	Percpcy5.5	SSC bajo, CD3+/CD4 +
Monocitos	APC	SSC medio, CD64 + fuerte
Linfocitos B	PECy7	SSC bajo; CD3-/CD19 +
Linfocitos T	APCCY7	SSC bajo, CD3 +
Linfocitos B	PB	SSC bajo, CD20+
Linfocitos totales	PO	SSC bajo, CD45 fuerte

Tabla 07: Parámetros leucocitarios evaluados en la selección de lisantes.

- Mejor coincidencia dentro de las 2DS en los parámetros de dispersión FSC/SSC

Para la evaluación de la superposición de los trazados en FSC y SSC se utilizará la herramienta Merge (superposición de dos o más archivos) del programa Infinicyt™ versión 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España) y elegirá el que tenga mayor

coincidencia dentro de las dos desviaciones estándar respecto al patrón (Lisado con Facs Lysing y adquirido en Facs Canto II). Estos datos serán ingresados en el campo respectivo de la ficha de recolección de datos.

- Adecuada discriminación de los linfocitos respecto al debris en FSC.

Otro parámetro importante es la separación entre linfocitos y debris (restos celulares), ya que el momento de analizar archivos de citometría es necesario poder discriminar nuestra población de interés (leucocitos) de los restos celulares y así tener datos precisos en el análisis. Esto se evaluará mediante el cálculo del índice de tinción "stain index" entre las medias del debris y linfocitos, mediante la siguiente fórmula:

MFI pos: índice de fluorescencia media de la población positiva.

$$\text{Stain Index} = \frac{MFI_{pos} - MFI_{neg}}{2\sigma_{neg}}$$

MFI neg: índice de fluorescencia media de la población negativa.

σ neg: Desviación estándar de la población negativa

Tomado de: www. Fluorofinder.com

Una vez recolectada la información se procederá al análisis de las mismas y elegir el lisante adecuado para Novocyte Advanteon basándose en los criterios mencionados previamente. Luego de definir la solución de lisis se iniciará el siguiente paso.

ii. Definición de voltajes y valores objetivos

Otros de los factores clave en la estandarización es establecer ajustes en el equipo que sean reproducibles a lo largo del tiempo, esto puede lograrse usando un estándar como perlas fluorescentes, para esto es necesario encontrar estos valores objetivos

que nos puedan garantizar resultados similares con otros instrumentos de diferentes marcas.

Para establecer voltajes y definir los valores objetivos se utilizaron tres muestras de sangre periférica en 3 días distintos, 1 muestra por cada día. Primero se realizará el control de calidad diario de ambos equipos, luego la adquisición y ajuste como se describe en el anexo 8. A continuación, se marcaron los controles de compensación para lo cual se usará 200ul de muestra con CD8 FITC, CD8 PE, CD3 APC, CD5 Percp cy5.5, CD20 Pacific Blue, CD19-TCRg/d PECY7, CD38 APCC750, CD45 OC515 los tres últimos marcadores mencionados son proporcionados en el Kit LST (Cytognos SL, Salamanca, España), estas muestras serán procesadas bajo el protocolo descrito en el SOP de EuroFlow™.

La mitad se adquirió en el Instrumento Patrón y se registró las medianas de las poblaciones positivas obtenidas en las estadísticas del programa Facs Diva (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) luego se realizó el cálculo tomando en cuentas las escalas, para este caso se trabajó el Novocyte Advanteon como un citómetro de 20 bits (ajuste de escalas).

Se ajustó los voltajes mediante el programa NovoExpress FSC 1.4.1 (Angilent) basándose en los valores calculados en el instrumento patrón y con los voltajes obtenidos se correrá Rainbow Beads 8 picos lote EAM01, se repetió este proceso en tres días distintos. Se analizó la adquisición de perlas con el programa Infinicyt™ versión 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España) y registro las medias y los coeficientes de variación de cada pico en los diferentes canales evaluados proporcionado por las estadísticas del programa de análisis. Los criterios para seleccionar el pico de referencia fueron: el pico más brillante que está dentro de escala log(1048576) y con menor coeficiente de variación. Para obtener los valores objetivos se promediaron los IFM (índice de florescencia media) del pico seleccionado obtenidos en los tres días para cada canal y el promedio fue usado para ajustar voltajes para el experimento de la evaluación de la base de datos y los próximos ajustes de voltajes que garanticen reproducibilidad en el tiempo y con otros citómetros de similares características.

Todos los valores obtenidos del índice de fluorescencia y coeficientes de variación fueron ingresados en la ficha de recolección de datos.

iii. Evaluación de la base de datos

Finalmente, para la evaluación de la base de datos se marcaron 100ul de muestras de sangre periférica de 25 donantes voluntarios sanos con el kit estandarizado LST (Cytognos SL, Salamanca, España) basándose en el protocolo descrito en el inserto (anexo 5). Luego fueron adquiridos en el instrumento patrón y en Novocyte Advanteon con los ajustes establecidos en el paso anterior. Finalmente, los archivos fueron exportados en formato FSC para ser analizados mediante el reconocimiento automático de poblaciones por la base de datos del programa Infinicyt™ versión 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España) y así determinar la compatibilidad.

Se evaluó el porcentaje de poblaciones reconocidas por la base de datos y las poblaciones en Chek (poblaciones que necesitan ser revisadas por el analista).

iv. Instrumento: Ficha de recolección de datos

Por último, los archivos en formato FCS obtenidos en cada experimento fueron analizados mediante el Software Infinicyt™ versión 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España)luego se exportaron los estadísticos de las poblaciones de interés (Porcentaje celular, media, CV, Desviación estándar) directamente a una hoja de cálculo en formato.csv para finalmente ser ingresados en la ficha de recolección de datos verificada por tres expertos en el área de citometría de flujo (anexo 3) elaborado en Microsoft Excel 2019.

2.1.7 PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS

Todos los datos obtenidos fueron ingresados en la ficha de recolección de datos elaborada en Microsoft Excel 2019, revisada por 3 expertos en el área (anexo 2). Estos datos fueron trasladados a una base de datos del programa estadístico MedCalc.

En principio se realizaron las pruebas descriptivas tomando en cuenta medidas de tendencia central como la media y desviación estándar, para todos los datos numéricos se realizó la prueba de normalidad mediante el test de Shapiro Wilk. En cuanto al análisis de la prueba de lisantes se optó por usar modelo de análisis de varianza (ANOVA) para muestras repetidas previa verificación de esfericidad, se evaluó el lisante patrón frente a las otras soluciones, tomando como significancia estadística al 95%(<0.05%).

2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio fue revisado por el comité de investigación de la Escuela Profesional de Tecnología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

La investigación necesitó de donantes voluntarios sanos para la corrida de tubos LST y prueba de lisantes, por lo cual se reclutaron personas mayores de 18 años los cuales brindaron su aceptación mediante la firma de consentimiento informado (anexo 1) de acuerdo a los principios éticos de la Declaración de Helsinki.

La recolección de datos solo abarcó información relevante para la investigación y a todos los participantes se les otorgó un código para mantener la confidencialidad de datos.

Este proyecto cuenta con el permiso institucional del laboratorio privado Cytometric Bioservices SAC y Biolab para el uso de instalaciones y equipos, mediante la autorización firmada por los representantes de cada centro de diagnóstico. (Anexo 4)

CAPITULO III: RESULTADOS

- **EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE LISANTES PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL CITÓMETRO NOVOCYTE ADVANTEON**

Uno de los principales obstáculos dentro de la estandarización usando diferentes citómetros fue la superposición de las poblaciones celulares en FSC/SSC, por lo cual en la presente investigación se busca demostrar la influencia del lisante en la dispersión frontal y lateral, así como seleccionar la solución adecuada para Novocyte Advanteon, sin perdida significativa de fluorescencia ni poblaciones celulares. Por esta razón para la elección del lisante adecuado se evaluaron los siguientes puntos.

i. Pérdida de celularidad:

Esta comparación fue evaluada tomando como referencia los leucocitos totales del hemograma inicial y el recuento celular volumétrico final del citómetro, luego del procesamiento de 10 muestras con los 4 lisantes en estudio.

La tabla 08 muestra los porcentajes promedio incluyendo la desviación estándar por cada lisante. La pérdida celular promedio fue de 46.04% bajo la metodología marcado-lisado-lavado. La solución lisante que mayor pérdida presentó fue Excellyse Easy, mientras que la menor fue mostrada por los lisantes Optylise C, Facs Lysing, Excellyse I presentó un rendimiento medio. A pesar de las diferencias, luego de la evaluación estadística mediante la prueba ANOVA para muestras repetidas no se encontró diferencias significativas ($p<0.05$) para la evaluación de pérdida celular entre los diferentes lisantes.

Lisantes	FACS Lysing	Excellyse Easy	Excellyse I	Optylise C	p valor
Porcentaje de pérdida celular (Leucocitos totales)	42.18± 13.81	54.27± 17.33	45.37± 16.05	42.36± 19.38	0.218

Tabla 08: Porcentaje de pérdida celular promedio tomando en cuenta los leucocitos totales entre los diferentes lisantes. *Test de Anova para muestras repetidas. ($p<0.05$), (Fuente: Propia)

ii. Distribución de las poblaciones:

En la tabla 09 podemos observar la frecuencia de las poblaciones celulares obtenidas luego del procesamiento con los 4 lisantes evaluados, los porcentajes encontrados son similares. Para determinar si la variación es significativa se aplicó la prueba de Anova para muestras repetidas tomando como referencia el lisante patrón (FACS Lysing) no se observó diferencias significativas en las poblaciones mayoritarias como neutrófilos, monocitos, linfocitos y eosinófilos. Sin embargo, la población de basófilos sí mostró diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$).

Lisante	FACS Lysing	Excellyse Easy	Excellyse I	Optylise C	P valor*
Neutrófilo	47.74 ± 10.24	47.21 ± 9.52	47.83 ± 9.13	49.10 ± 10.46	0.571
Monocito	7.61 ± 2.36	7.78 ± 2.51	8.19 ± 3.25	7.61 ± 2.76	0.314
Linfocito	38.97 ± 6.67	40.21 ± 7.66	38.05 ± 6.81	37.08 ± 7.06	0.193
Eosinófilo	4.55 ± 6.53	3.73 ± 4.74	4.96 ± 7.24	5.29 ± 7.68	0.215
Basófilo	1.11 ± 0.47	1.05 ± 0.43	0.97 ± 0.47	0.90 ± 0.44	0.024*

Tabla 09: Frecuencia de las poblaciones celulares en sangre periférica con los diferentes lisantes probados. *Test de Anova para muestras repetidas. ($p<0.05$), (Fuente: Propia)

Por lo cual para los basófilos se aplicó la comparación por pares encontrándose diferencias significativas entre el lisante patrón, Optylise C y Excellyse I como se puede observar en la tabla 10. Sin embargo, estas diferencias pueden deberse a la baja frecuencia de esta población celular.

% Basófilos			Mean Difference	Std. Error	P *	IC al 95% ª
FACS_LYSING	-	EXCELLYSE_EASY	-0.411	0.163	0.1969	-0.961 a 0.138
	-	EXCELLYSE_I	-2.564	0.299	0.0001	-3.570 a - 1.559
	-	OPTYLISE_C	-3.034	0.157	<0.0001	-3.561 a - 2.506

Tabla 10: Comparación por pares para Basófilos entre Facs Lysing y los lisantes en evaluación. *Prueba de Bonferroni(p<0.05), (Fuente: Propia)

iii. Separación entre linfocitos y debris

La mejor discriminación entre linfocitos y debris luego de la evaluación de las 10 muestras se logró con Optylise C y Excellyse I con un Stain Index promedio de 5.05 ± 0.46 y 4.58 ± 0.78 respectivamente. Los lisantes con menor resolución para diferenciar linfocitos y debris fueron Facs Lysing y Excellyse I como se observa en la tabla 11. Al aplicar el test de Anova se observó diferencias significativas entre los grupos p<0.05; por lo cual se aplicó la comparación por pares mediante la prueba de Bonferroni (tabla 12) se evidenció diferencias significativas entre Facs Lysing, Optylise C y Excellyse I; mientras que Facs Lysing frente a Excellyse Easy no mostró significancia estadística.

Finalmente se consideran a Optylice C y Excellyse I como mejores opciones para este paramétro por facilitar la discriminación entre el debris y las poblaciones de linfocitos.

Lisantes	FACS Lysing(n=10)	Excellyse Easy (n=10)	Excellyse I (n=10)	Optylise C (n=10)	P value*
Stain Index	2.01 ± 0.41	2.42 ± 0.58	4.58 ± 0.78	5.05 ± 0.46	<0.001*

Tabla 11: Stain Index (Cálculo de la separación entre el debris y linfocitos en FSC) *Test de Anova para muestras repetidas. (p<0.05), (Fuente: Propia)

Stain Index			Mean Difference	Std. Error	P *	95% CI [a]
FACS_LYSING	-	EXCELLYSE_EASY	-0.411	0.163	0.1969	-0.961 a 0.138
	-	EXCELLYSE_I	-2.564	0.299	0.0001*	-3.570 a -1.559
	-	OPTYLISE_C	-3.034	0.157	<0.0001*	-3.561 a -2.506

Tabla 12: Prueba de Bonferroni para la separación entre el debris y los linfocitos (Stain Index). *Prueba de Bonferroni($p<0.05$), (Fuente: Propia)

iv. Distribución en FSC y SSC

Para evaluar este punto se usó la herramienta Merge del software Infinicyt, que superpone las adquisiciones del instrumento patrón procesadas con Facs Lysing frente a las mismas muestras adquiridas en Novocyte Advanteon procesadas con los lisantes en evaluación. La tabla 13 muestra los resultados obtenidos tomando en cuenta las medias y el número de muestras que se encuentran en 1DS, 2 DS y >2 DS para cada población. Para los neutrófilos, monocitos y linfocitos el de mayor similitud fue Excellyse Easy; sin embargo, para las poblaciones de eosinófilos y basófilos todas las muestras cayeron fuera de las dos desviaciones estándar. Optylise C presentó distribuciones similares al patrón para neutrófilos, monocitos y linfocitos, pero para basófilos el 50% de las muestras cayó fuera de las dos desviaciones estándar. Para eosinófilos el total de muestras tuvo dispersiones por encima de 2 desviaciones estándar. En el caso de Excellyse I mostró menor variación de las dispersiones de poblaciones frente al lisante patrón; solo en 4 muestras en el parámetro de neutrófilos, tuvieron dispersión mayor de 2DS, para el resto de las poblaciones el total de muestras está entre 1 y 2 DS. Los resultados se muestran en el gráfico 4. De acuerdo con estos hallazgos el lisante que muestra mejor superposición en los parámetros de dispersión FSC/SSC es Excellyse I, este parámetro es clave para la evaluación con la base de datos debido a que es uno de los pasos del algoritmo del software, para el reconocimiento automático de las poblaciones.

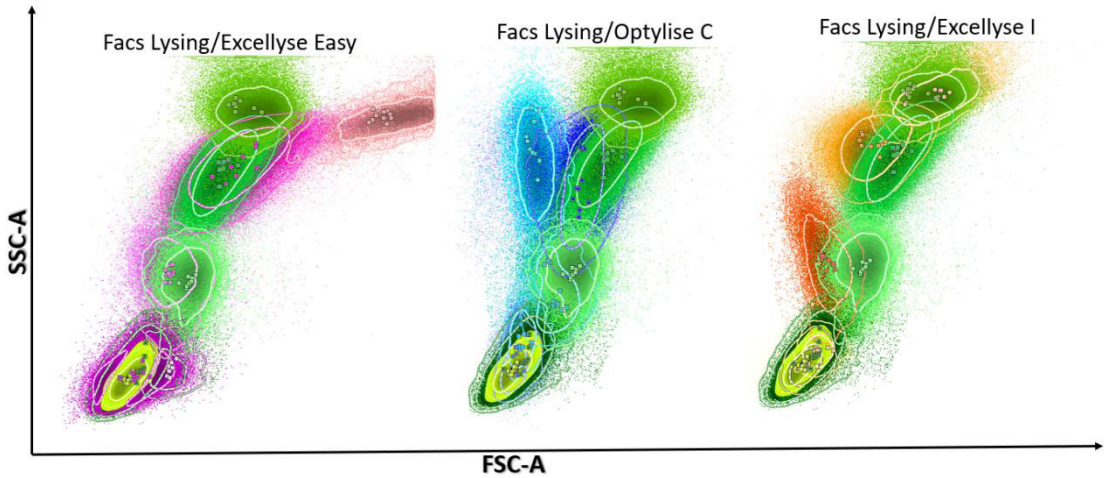


Gráfico 4: Superposición gráfica de las diferentes subpoblaciones en FSC/SSC, en verde los archivos del lisante patrón, rosado-fucsia (Excellyse Easy), azul-celeste (Optylise C), amarillo-naranja (Excellyse I). Visualmente se observa mejor superposición de todas las poblaciones con el lisantes Excellyse I. (Fuente: Propia)

Facs Lisyng	**OPTYLISE C**			**EXCELLYSE EASY**			**EXCELLYSE I**		
Poblaciones	1DS	2DS	>2DS	1DS	2DS	>2DS	1DS	2DS	>2DS
NEU	4	6	0	9	1	0	1	5	4
MON	0	10	0	10	0	0	0	10	0
LIN	10	0	0	10	0	0	8	2	0
BAS	0	5	5	0	0	10	0	10	0
EOS	0	0	10	0	0	10	10	0	0
TOTAL	14	21	15	29	1	20	19	27	4

Tabla 13: Evaluación de los lisantes basándose en las medias y desviación estándar (Fuente: Propia)

v. Pérdida de fluorescencia y aumento del CV

En el gráfico 5 se muestra el diagrama de cajas en base al promedio de los índices de fluorescencia media ± desviaciones estándar de las 10 muestras evaluadas por cada fluorocromo. La mayor pérdida de fluorescencia se observó en PE para las

muestras procesadas con Optylise C, además se evidenció disminución de IFM en APC en las muestras procesadas con Excellyse Easy ambas con significancia estadística, como se puede observar en las tablas 15 y 16.

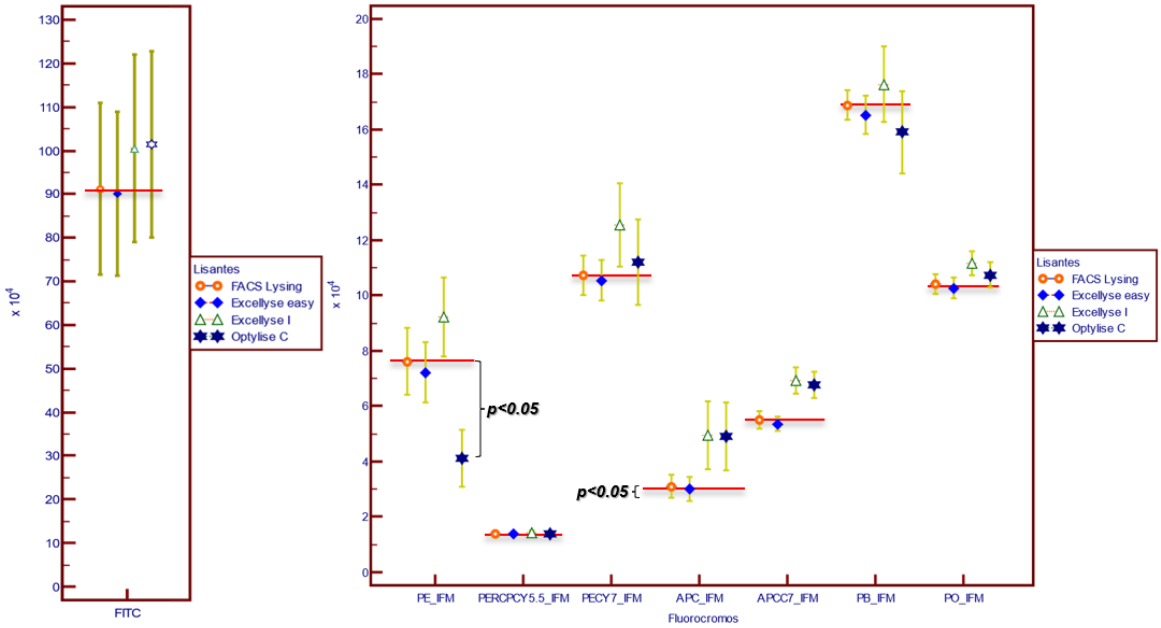


Gráfico 5: Evaluación de la pérdida de Intensidad de Fluorescencia Media por los lisantes (IFM x10^4) *Test de Anova para muestras repetidas. ($p<0.05$), (Fuente: Propia)

Fluorocromo	FACS Lysing	Excellyse Easy	Excellyse I	Optylise C	p value
FITC	91.19 ± 27.49	90.09 ± 26.14	100.5 ± 30.01	101.41 ± 27.77	<0.001
PE IFM	7.61 ± 1.69	7.21± 1.52	9.23 ± 2	4.10 ± 1.44	<0.001*
PercpC5.5 IFM	1.38 ± 0.10	1.37± 0.10	1.43 ± 0.09	1.37± 0.49	0.19
PECy7 IFM	10.72 ± 0.99	10.55 ± 1.01	12.55 ± 2.08	11.20 ± 2.17	0.006
APC IFM	3.10 ± 0.57	3 ± 0.60	4.9 ± 1.70	4.92 ± 1.72	0.003*
APCCy7 IFM	5.50 ± 0.43	5.35 ± 0.35	6.93 ± 0.67	6.77 ± 0.66	<0.001
PB IFM	16.87 ± 0.74	16.52 ± 0.98	17.6 ± 1.91	15.90 ± 2.07	0.031
PO IFM	10.40 ± 0.48	10.27± 0.54	11.15 ± 0.30	10.74 ± 0.64	< 0.001

Tabla 14: Evaluación de la pérdida de florescencia (IFM x10^4) respecto al lisante de referencia. *Test de Anova para muestras repetidas. ($p<0.05$), (Fuente: Propia)

IFM PE			Mean Difference	Std. Error	P *	95% CI [a]
FACS LYSING	-	EXCELLYSE_EASY	4058.594	1466.356	0.1310	-874.527 to 8991.715
	-	EXCELLYSE_I	-16200.556	3802.659	0.0127	-28993.473 to -3407.639
	-	OPTYLISE_C	35107.121	4007.689	0.0001*	21624.440 to 48589.802

Tabla 15: Prueba de Bonferroni para los IFM de PE de los fluorocromos. *Prueba de Bonferroni(p<0.05). (Fuente: Propia)

IFM APC			Mean Difference	Std. Error	P *	95% CI [a]
FACS_LYSING	-	EXCELLYSE_EASY	990.664	291.044	0.0470*	11.534 a 1969.794
	-	EXCELLYSE_I	-18572.056	4835.025	0.0238	-34838.064 a -2306.048
	-	OPTYLISE_C	-18205.984	4868.383	0.0278	-34584.214 a -1827.754

Tabla 16: Prueba de Bonferroni para los IFM de APC de los fluorocromos. *Prueba de Bonferroni(p<0.05). (Fuente: Propia)

En la tabla 17 se muestra el promedio de los coeficientes de variación (CV) de los ocho flurocromos evaluados con los diferentes lisantes. En los fluorocromos PE y Pacific Blue (PB) observamos diferencias significativas, el mayor incremento de CV respecto al lisante patrón se observó en PE con el lisante Optylise C, cuando se evaluó PB por la prueba de Bonferroni no se observó significancia estadística frente al lisante patrón. (Tabla 18 y 19)

Fluorocromo (CV)	FACS Lysing	Excellyse Easy	Excellyse I	Optylise C	P value
FITC	22.61 ± 2.16	22.35 ± 2.62	24.28 ± 2.51	21.80 ± 1.29	0.102
PE	97.58 ± 20.66	101.63 ± 23.80	95.10 ± 25.15	127.59 ± 31.78	<0.001*
PERCPCY5.5	20.46 ± 0.92	20.73 ± 0.88	21.11 ± 1.16	21 ± 1.18	0.109
PECY7	41.29 ± 6.33	42.93 ± 7.44	43.54 ± 8.62	45.97 ± 8.84	0.228
APC	36.20 ± 4.75	36.33 ± 5.64	33.55 ± 2.71	33.13 ± 1.97	0.135
APCC7	80.14 ± 12.46	80.39 ± 12.40	70.20 ± 21.13	69.62 ± 20.35	0.101
PB	43.20 ± 3.14	43.74 ± 3.71	47.66 ± 7.05	48.94 ± 7.63	0.014*
PO	34.83 ± 22.83	24.85 ± 1.43	25.27 ± 1.06	26.39 ± 1.09	0.233

Tabla 17: Coeficientes de variación de los fluorocromos. *Test de Anova para muestras repetidas. (p<0.05). (Fuente: Propia)

CV PE			Mean Difference	Std. Error	P *	95% CI [a]
FACS LYSING	-	EXCELLYSE EASY	-4.050	2.248	0.6305	-11.612 a 3.512
	-	EXCELLYSE I	2.398	3.730	1.0000	-10.151 a 14.947
	-	OPTYLISE C	-30.003	4.665	0.0007*	-45.696 a -14.310

Tabla 18: Prueba de Bonferroni para los CV de PE de los fluorocromos. *Prueba de Bonferroni(p<0.05). (Fuente: Propia)

CV PB			Mean Difference	Std. Error	P *	95% CI [a]
FACS LYSING	-	EXCELLYSE EASY	-0.543	0.560	1.0000	-2.426 a 1.340
	-	EXCELLYSE I	-4.463	1.460	0.0819	-9.376 a 0.450
	-	OPTYLISE C	-5.740	1.837	0.0733	-11.919 a 0.439

Tabla 19: Prueba de Bonferroni para los CV de PB de los fluorocromos. *Prueba de Bonferroni(p<0.05). (Fuente: Propia)

Luego de la evaluación de todos los parámetros podemos resaltar que en cuanto a la pérdida celular no se evidencio diferencias significativas entre los diferentes lisantes en evaluación, solo se observó variaciones en la distribución de las poblaciones celulares de basófilos para los lisantes Excellyse I y Optylise C. Sin embargo, en el resto de las poblaciones más abundantes no se evidencio variaciones significativas.

Finalmente, luego de la evaluación de 3 lisantes diferentes en el citómetro Novocyte Advanteon, la solución de lisis que ofrece un rendimiento similar a la referencia corresponde al Excellyse I que demostró una buena superposición en los parámetros de dispersión FSC/SSC, permite una adecuada discriminación entre linfocitos y debris, además un bajo CV, sin evidencia de pérdida de fluorescencia, ni poblaciones celulares.

- **CÁLCULO DE VALORES TARGET (IFM) PARA NOVOCYTE ADVANTEON EMPLEANDO MATERIAL DE REFERENCIA (PERLAS RAINBOW).**

Luego del ajuste del instrumento patrón de acuerdo con lo recomendado por el protocolo Euroflow se realizó la adquisición de los controles de compensación en ambos equipos sin aplicar ninguna matriz, se realizaron los ajustes descritos en el capítulo anterior para establecer voltajes en Novocyte Advanteon, Con estos voltajes se realizó la adquisición de las perlas Rainbow Beads y se obtuvieron los valores de IFM y CV en tres días distintos.

Los parámetros de SSC y FSC fueron establecidos con sangre periférica lisada de donantes en base a los valores 52 000 y 220 000 respectivamente. Para los canales de fluorescencia se obtuvo el promedio y se eligió el pico de referencia considerando el de mayor IFM que permanezca dentro de escala y con menor CV. En base a estos puntos se seleccionó el séptimo pico como referencia, en la tabla 20 se muestra los valores de IFM y CV obtenidos, los valores MFI referenciales se usaron para ajustar los voltajes de Novocyte Advanteon para el siguiente experimento y evaluar su utilidad.

Fluorocromo	IFM	CV
FITC	100753	2.83
PE	180057	2.60
PERCPCY5.5	469455	3.20
PECY7	31687	4.68
APC	557260	4.35
APCC750	126327	5.14
PB	465826	4.12
OC515	323625	4.49

Tabla 20: Valores de Target de IFM y CV de Novocyte Advanteon. (Fuente: Propia)

- **EVALUACIÓN DE LA ESTANDARIZACIÓN MEDIANTE EL PORCENTAJE DE RECONOCIMIENTO AUTOMÁTICO POR LA BASE DE DATOS**

i. Evaluación de la base de datos

Para corroborar la estandarización se usó la base de datos de software Infinicyt, una vez elegido el lisante y establecido los ajustes de voltajes en base a los valores diana obtenidos en los pasos anteriores, se realizó la prueba final con la corrida de 25 muestras de sangre periférica marcados con el Kit LST. Sin embargo, se retiraron 5 muestras por defectos en la técnica de procesamiento.

Las 20 muestras fueron marcadas con el kit de LST lisadas con el lisante patrón y adquiridas en Facs Canto II, para Novocyte Adavanteon fueron lisadas con Excellyse I, para luego ser analizadas mediante la herramienta de base de datos del Software Infinicyt el cual compara con archivos precargados que fueron procesados

bajo protocolos estandarizados, los reconoce automáticamente y los categoriza en la población correspondiente.

Se obtuvo un alto porcentaje de reconocimiento de la base de datos > 95% en 19/20 casos, solo un caso obtuvo 91.3%. De esta manera se demuestra que nuestros resultados son comparables a los procesados bajo las recomendaciones Euroflow y que el protocolo propuesto es útil para la estandarización de Novocyte Advanteon.

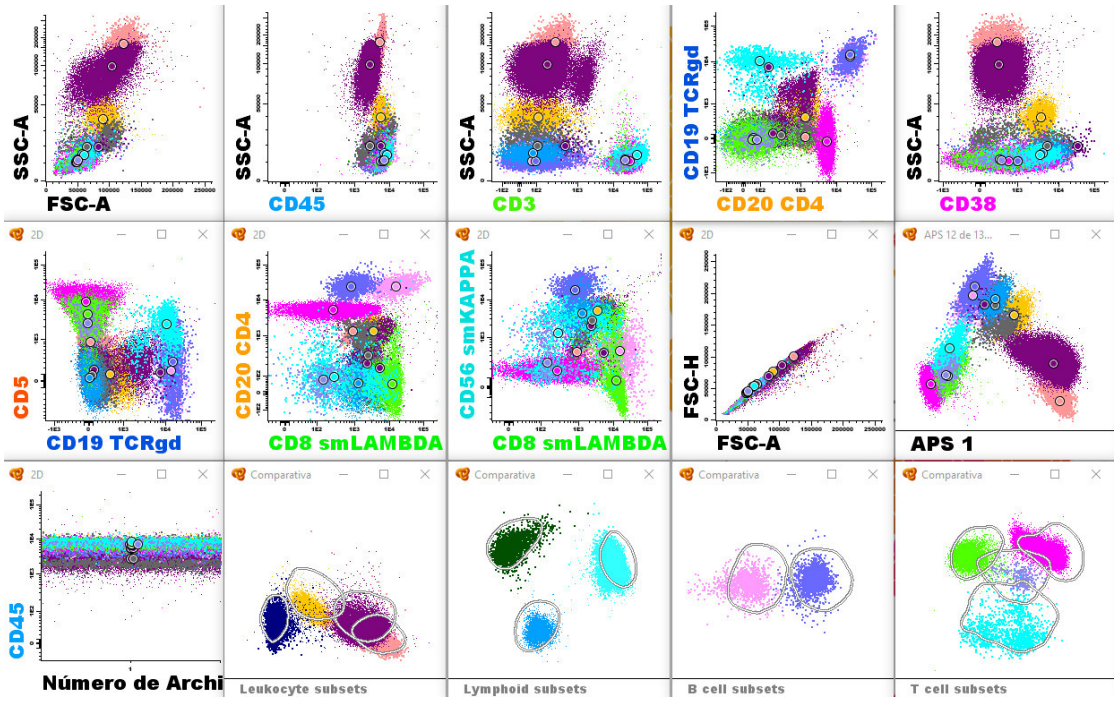


Gráfico 6: Archivo procesado con el lisante e instrumento de referencia y analizado en la base de datos. (Fuente: Propia)

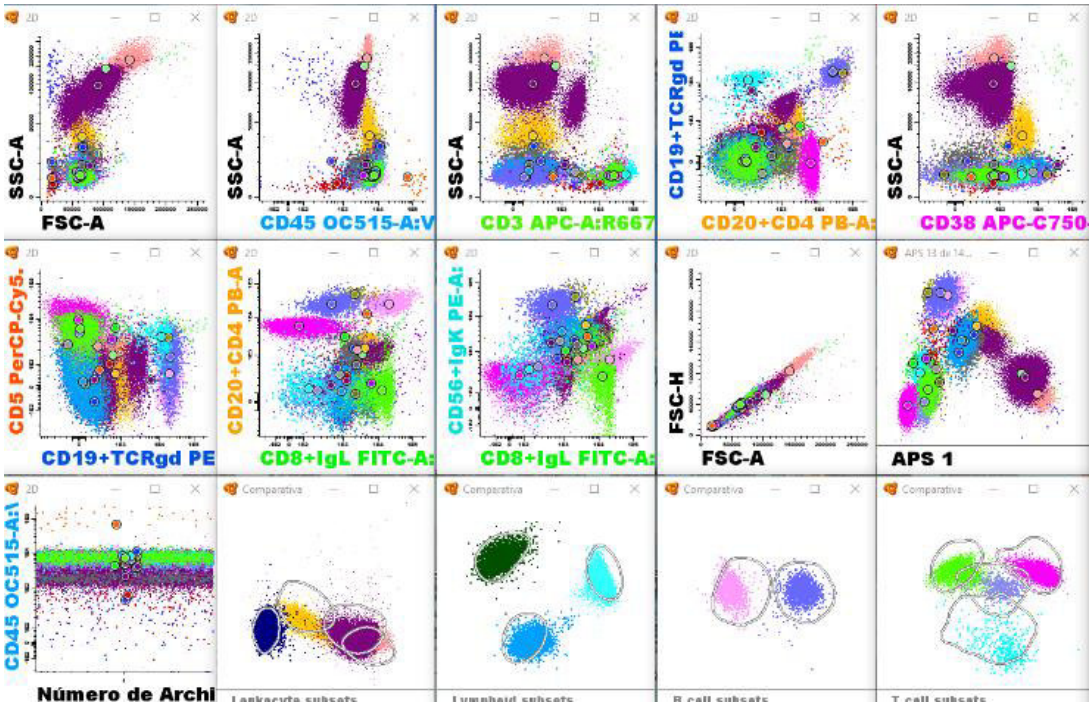


Gráfico 7: Archivo procesado con el lisante Excellyse I, adquirido en Novocyte Advanteon y analizado en la base de datos. (Fuente: Propia)

ii. Evaluación de los porcentajes celulares

Como dato adicional se realizó el análisis de los porcentajes celulares entre ambos equipos de las principales poblaciones y como se muestra en el gráfico 08 y la tabla 21 se observaron resultados semejantes. Para el análisis estadístico de la comparación entre Advanteon y Facs Canto II se realizó la prueba de correlación de Pearson, que mediante un dispersograma se observó la linealidad de ambos métodos. Además, se evaluó la concordancia por el coeficiente de correlación de Lin. Los análisis se realizaron en MedCalc® Statistical Software versión 20.027 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; https://www.medcalc.org; 2022). Como se muestra en la tabla 21 y en el gráfico 8 se observó buenas correlaciones para todas las poblaciones evaluadas ≥0.96% para todas las poblaciones y con significancia estadística $p<0.05$. Para realizar un análisis más fino ya que muchas veces las pruebas de correlación no son tan exactas se hizo la prueba de Lin obteniéndose una concordancia casi perfecta >0.99 para los linfocitos NK, sustancial ≥0.95 para el resto de las subpoblaciones linfocitarias, neutrófilos, eosinófilos y moderada ≥0.90 para las poblaciones de monocitos. Demostrando de

los porcentajes celulares obtenidos entre ambos métodos presentan buena concordancia.

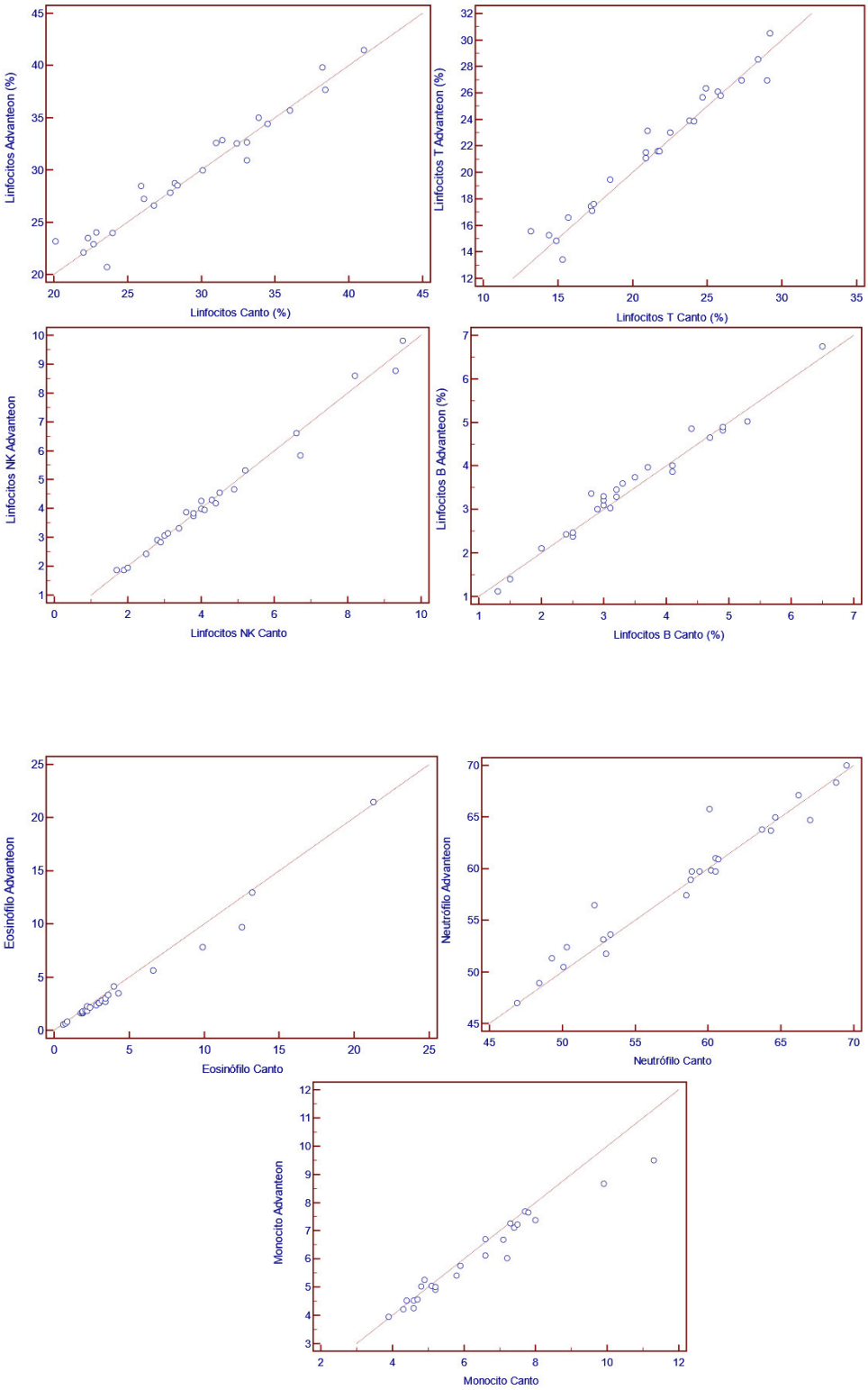


Gráfico 8: Evaluación de las correlaciones de los porcentajes celulares entre el instrumento de referencia y Novocyte Advanteon. (Fuente: Propia)

Parámetros	Coeficiente de concordancia de LIN	Coeficiente de correlación de Pearson	Exactitud
Linfocitos	0.97	0.97	0.99
Linfocitos T	0.97	0.97	0.99
Linfocitos B	0.98	0.98	0.99
Linfocitos NK	0.99	0.99	0.99
Eosinófilos	0.98	0.99	0.99
Neutrófilos	0.96	0.96	0.99
Monocitos	0.94	0.97	0.96

Tabla 21: Comparación de poblaciones celulares y linfocitarias del kit LST entre Novocyte Advanteon y el instrumento de referencia. (Fuente: Propia)

Finalmente, en base a los experimentos desarrollados se demuestra la estandarización para el estudio de linfocitos tomando en cuenta los ajustes propuestos. Los archivos obtenidos son comparables a la base de datos, que fueron procesados de manera estandarizada en diversos centros y con diferentes instrumentos. Mediante el uso del lisante recomendado Excellyse I y los valores Target obtenidos con las Rainbow Beads, se logró un reconocimiento mayor al 90% en el total de casos y >95% en el 95% de las muestras de donantes sanos evaluadas. Además, no se observó diferencias significativas en los porcentajes celulares que influyan en la interpretación diagnóstica.

CAPITULO IV: DISCUSIÓN

La citometría de flujo es una técnica que cumple un rol importante en el diagnóstico y seguimiento de neoplasias hematológicas y es reconocida por la OMS. (29) En ese sentido, La necesidad de obtener datos objetivos y reproducibles en los que poyar la toma de decisiones, es un requisito de cualquier prueba diagnóstica incluida la citometría de flujo.(5), por lo cual es necesario el uso de procesos estandarizados que reduzcan la variabilidad entre diferentes laboratorios, aunque se usen diferentes instrumentos.

A pesar de sus limitaciones por la gran variabilidad en la técnica y el lanzamiento de diversas tecnologías, es importante armonizar los procesos de acuerdo a recomendaciones estandarizadas con los reactivos y equipos disponibles. Se tomó como referencia a Euroflow debido a que su propuesta involucra todo el proceso, el enfoque en el diagnóstico de neoplasias hematológicas y su amplio uso en Latinoamérica. En ese sentido la presente investigación propone un protocolo de ajuste de instrumento y lisante para la estandarización de Novocyte Advanteon con resultados comparables a los obtenidos usando el equipo y lisante recomendado por Euroflow.

En principio Novakova et al. realizó un estudio previo con una versión anterior del instrumento Novocyte, sin embargo no se obtuvieron buenos resultados por las características intrínsecas del mismo, los detectores compartidos dificultaron el proceso(4). En base a esas recomendaciones en la presente investigación se usaron versiones más recientes y con detectores independientes de manera que fuera posible realizar el ajuste de voltajes para cada fluorescencia, previa evaluación de la configuración óptica del instrumento y valorar que cuenten con los láseres rojo, azul y violeta, además verificar los filtros necesarios para los fluorocromos propuestos. La versión Novocyte Advanteon VBR cumplía con estos lineamientos.

Con respecto al estudio de voltajes existen varios protocolos planteados en la literatura Cornel et al planteó dos protocolos distintos en base a perlas de calibración y con perlas de compensación obteniendo los mejores resultados con perlas de compensación marcadas individualmente con un CV <15%(6). Asimismo, Novakova et al. Recomienda el ajuste en base al uso de perlas de tipo IIB (coincidencia espectral) logrando que las adquisiciones estandarizadas en

cualquiera de las plataformas y este protocolo pueda ser usado en cualquier nuevo instrumento.(4) Para nuestros experimentos no contamos con perlas IIB y por temas de costos optamos por usar muestras de células marcadas individualmente con cada fluorocromo, similar al planteado por Solly et al. en el cual usaron polimorfonucleares marcados con CD16 y luego Rainbow Beads demostrando que es un método viable que permite una sólida armonización. Cabe mencionar que en todos los protocolos mencionados se usó Facs Canto II como instrumento de referencia, los instrumentos armonizados son de diferentes fabricantes, escalas y rango dinámico que mediante conversiones matemáticas fue posible la estandarización. Tomado en cuenta estos estudios previos para nuestros experimentos planteamos el uso de Facs Canto II como instrumento patrón con un protocolo de células marcadas individualmente que fueron usados para dos objetivos el ajuste de voltajes y como controles de compensación, fueron corridos por tres días para reducir la variación diaria del instrumento, también usamos Rainbow Beads para obtener valores target de acuerdo a lo recomendado por lo recomendado por Kalina et al. en la propuesta de ajuste de instrumento del grupo Euroflow (3) y en el futuro pueda realizarse el ajuste de voltajes en base a los valores objetivos hallados.

Una de las principales dificultades al momento de realizar la armonización de equipos fue la variabilidad en las señales de dispersión FSC y SSC debido a las diferencias en las configuraciones entre fabricantes como lo describe Glier et al. En el presente estudio también se tuvieron las mismas dificultades, como se muestra en las gráficas de la sección de resultados la dispersión de eosinófilos en FSC usando el lisante Facs Lysing es distinta en Novocyte Advanteon, por esta razón y en base a observaciones previas se decidió probar lisantes que nos proporcione dispersiones parecidas a las obtenidas en el instrumento patrón y de esta manera reducir la variabilidad en las adquisiciones. Usamos Facs Lysing como lisante patrón ya que es el lisante recomendado y el que mostró mejores resultados en los protocolos de Euroflow (20) Luego de la evaluación de tres lisantes se optó por el lisante Excellyse I ya que mostro dispersiones similares en FSC/SSC, buena separación entre el debris y linfocitos, conservando todas las florescencias estudiadas incluso los tándems, sin evidencia pérdidas significativas de celularidad

respecto al lisante patrón y sin incrementos significativos de CV. Estos puntos de evaluación para la prueba de lisantes fueron tomados en base a los abordados por Flores Montero et al. (22) y X. Bossyut et al.(30) De esta manera demostramos que el lisante tiene un impacto en la inmunofenotipificación y puede influir en la dispersión FSC/SSC.

La pérdida de fluorescencia en PE y APC mostrada por Optylice C podría explicarse por el protocolo recomendado por el fabricante, ya que los lisantes a los que se agrega formol al final muestran menores IFM, según lo señalado por Flores Montero et al.(22)

Para la evaluación final de la estandarización se tomó como referencia la base de datos del Software Infinicyt, ante la poca disponibilidad de ejecutar un estudio multicéntrico que se estableció como una limitante de la investigación realizada; la comparación por esta modalidad fue una opción más viable, debido a que esta herramienta está conformada por archivos procesados en diversos centros bajo los estándares de Euroflow tomando en consideración la variabilidad biológica y técnica respecto a diferentes laboratorios, instrumentos y operadores. (31) Los resultados obtenidos tiene un reconocimiento automático por la base de datos >95% en 19 de 20 caso evaluados, en el caso restante se obtuvo un reconocimiento >91% estos resultados son similares a los obtenidos por Flores Montero et al. que obtuvo >95% en muestra normales evaluadas durante el armado de la base de datos LST, cuando se realizaron la evaluación de porcentajes celulares entre ambos métodos se obtuvo buena correlación con r^2 >0.96 para todas la poblaciones evaluadas y con significancia estadística $p<0.05$, similares a los obtenidos por Flores Montero et al. (9) Adicionalmente para complementar la comparación con la base datos se realizó la prueba de Lin, la cual también demostró buen desempeño del citómetro Novocyte en el análisis de poblaciones linfocitarias.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

Se concluye que se acepta la hipótesis ya que los resultados obtenidos demuestran que es posible la estandarización del citómetro Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos mediante el uso de la base de datos del Software Infinicyt 2.0 comparables a los obtenidos bajo las recomendaciones del consorcio EuroFlow™.

En cuanto a la evaluación y selección de lisantes, se optó por Excellyse I, ya que demostró mejor superposición en FSC/SSC para Novocyte Advanteon comparándolos con los archivos del intrumento de referencia procesados con el lisante patrón; sin evidenciar pérdida de fluorescencia ni poblaciones celulares significativas. Demostrando que la elección del lisante adecuado para el instrumento puede disminuir la variabilidad de las dispersiones frontales y laterales ocasionadas por las diferencias en las configuraciones de cada fabricante.

El protocolo usado en la presente investigación para el ajuste de voltajes en base a células marcadas y perlas de referencia es útil para la estandarización de otros instrumentos. Además, los valores Target obtenidos pueden ser usados en otros instrumentos de idénticas características, para la obtención de resultados comparables a equipos estandarizados.

Los resultados de esta investigación demuestran que es factible el uso de la herramienta base de datos de Infinicyt con archivos adquiridos en citómetros Novocyte Advanteon, obteniéndose reconocimiento automático >95% del total de poblaciones celulares en muestras normales. La alta coincidencia con la base de datos depende en gran medida del cumplimiento estricto de los protocolos de marcaje y lisis, según indicaciones del fabricante y SOP estandarizados.

5.2 RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones se sugiere desarrollar estudios multicéntricos que involucre varios equipos de las mismas características y determinar la variabilidad de los valores *target* obtenidos en el presente estudio. Así como el uso de otros paneles usando muestras normales y patológicas.

Se sugiere la evaluación de lisantes bajo el modelo propuesto u otros estudios más amplios, cuando se observe diferencias en los trazados FSC/SSC. Ya que un lisante adecuado puede disminuir la variabilidad de las configuraciones entre fabricantes y de esta manera obtener resultados estandarizados.

Se recomienda que todo laboratorio que emplee la citometría de flujo para estudios diagnósticos y clínicos estandarice sus plataformas de trabajo. Si no se cuenta con un protocolo o guía armonizada para la estandarización, se recomienda seguir estrictamente los protocolos desarrollados por el fabricante y SOP estandarizados, ya que tiene un alto impacto en la concordancia con la base de datos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Kalina T. Reproducibility of Flow Cytometry Through Standardization: Opportunities and Challenges. Cytometry A. febrero de 2020;97(2):137-47.

2. Pérez-Lara JC, Santiago-Cruz W, Homero-Ramírez, Héctor, Rodríguez-Alba JC. Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. Revista Médica de la Universidad Veracruzana. diciembre de 2018;18(2):41-52.

3. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. Leukemia. septiembre de 2012;26(9):1986-2010.

4. Nováková M, Glier H, Brdičková N, Vlková M, Santos AH, Lima M, et al. How to make usage of the standardized EuroFlow 8-color protocols possible for instruments of different manufacturers. J Immunol Methods. 2019;475:112388.

5. Sewell WA, Smith SABC. Polychromatic flow cytometry in the clinical laboratory. Pathology (Phila). octubre de 2011;43(6):580-91.

6. Cornel AM, van der Burght CAJ, Nierkens S, van Velzen JF. FACSCanto II and LSRFortessa flow cytometer instruments can be synchronized utilizing single-fluorochrome–conjugated surface-dyed beads for standardized immunophenotyping. J Clin Lab Anal [Internet]. 20 de mayo de 2020 [citado 20 de octubre de 2020];34(9). Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7521264/

7. Glier H, Novakova M, te Marvelde J, Bijkerk A, Morf D, Thurner D, et al. Comments on EuroFlow standard operating procedures for instrument setup and compensation for BD FACS Canto II, Navios and BD FACS Lyric instruments. J Immunol Methods. 1 de diciembre de 2019;475:112680.

8. Glier H, Heijnen I, Hauwel M, Dirks J, Quarroz S, Lehmann T, et al. Standardization of 8-color flow cytometry across different flow cytometer

instruments: A feasibility study in clinical laboratories in Switzerland. J Immunol Methods. diciembre de 2019;475:112348.

9. Flores-Montero J, Grigore G, Fluxá R, Hernández J, Fernandez P, Almeida J, et al. EuroFlow Lymphoid Screening Tube (LST) data base for automated identification of blood lymphocyte subsets. J Immunol Methods. 1 de diciembre de 2019;475:112662.

10. van der Velden VHJ, Flores-Montero J, Perez-Andres M, Martin-Ayuso M, Crespo O, Blanco E, et al. Optimization and testing of dried antibody tube: The EuroFlow LST and PIDOT tubes as examples. J Immunol Methods. 1 de diciembre de 2019;475:112287.

11. Lhermitte L, Mejstrikova E, van der Sluijs-Gelling AJ, Grigore GE, Sedek L, Bras AE, et al. Automated database-guided expert-supervised orientation for immunophenotypic diagnosis and classification of acute leukemia. Leukemia. 2018;32(4):874-81.

12. Solly F, Rigollet L, Baseggio L, Guy J, Borgeot J, Guérin E, et al. Comparable flow cytometry data can be obtained with two types of instruments, Canto II, and Navios. A GEIL study. Cytom Part J Int Soc Anal Cytol. diciembre de 2013;83(12):1066-72.

13. Wulff S. Flow Cytometry Educational Guide. 2da ed. editado por Dako, California, EUA. 120pp [Internet]. Disponible en: http://www.gene-quantification.org/dako-facs-guide.pdf

14. Schroeder G, Swartzendruber D. Introduction to flow cytometry. Vol. 5.1. USA; 2004.

15. Wang L, Hoffman RA. Standardization, Calibration, and Control in Flow Cytometry. Curr Protoc Cytom [Internet]. enero de 2017 [citado 24 de noviembre de 2020];79(1). Disponible en: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpcy.14

16. Schwartz A, Marti GE, Poon R, Gratama JW, Fernández-Repollet E. Standardizing flow cytometry: A classification system of fluorescence standards used for flow cytometry. Cytometry. 1998;33(2):106-14.

17. Fluorophore Families [Internet]. [citado 31 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.biolegend.com/en-us/fluorophore-families

18. Agilent. NovoCyte Advanteon Flow Cytometer Operator´s Guide [Internet]. First Edition; 2019. Disponible en: www.agilent.com

19. Baggiani K, Rajab A, Andrew R. Flow Cytometer Standardization in the Clinical Laboratory [Internet]. ICCS e-Newsletter Vol. VII, N°2. 2016 [citado 29 de diciembre de 2020]. Disponible en: https://www.cytometry.org/public/newsletters/eICCS-7-2/article2.php

20. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n - dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia. septiembre de 2012;26(9):1908-75.

21. Hedley BD, Keeney M, Popma J, Chin-Yee I. Novel lymphocyte screening tube using dried monoclonal antibody reagents. Cytometry B Clin Cytom. diciembre de 2015;88(6):361-70.

22. Flores-Montero J. Nuevas estrategias metodológicas y de análisis de datos de citometría de flujo aplicadas al diagnóstico y clasificación de las hemopatías malignas. [Tesis doctoral]. [Salamanca, España]: Universidad de Salamnca; 2016.

23. Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. Haematologica. julio de 2001;86(7):675-92.

24. Macey MG, McCarthy DA, Milne T, Cavenagh JD, Newland AC. Comparative study of five commercial reagents for preparing normal and leukaemic lymphocytes for immunophenotypic analysis by flow cytometry. Cytometry. 15 de agosto de 1999;38(4):153-60.

25. Elsevier. Definición y tipos de linfocitos, y sus correlaciones clínicas (linfoma de Hodgkin) [Internet]. Elsevier Connect. [citado 23 de agosto de 2021]. Disponible en: https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/tipos-de-linfocitos-linfoma-Hodgkin

26. Robledo GBV. Linfocitos. Rev Fac Med UNAM. 2009;52(6):276-7.

27. Hedley BD, Cheng G, Keeney M, Kern W, Padurean A, Luider J, et al. A multicenter study evaluation of the ClearLLab 10C panels. Cytometry B Clin Cytom. 2021;100(2):225-34.

28. LST: Lymphoid Screening Tube [Internet]. Cytognos, S.L. [citado 23 de agosto de 2021]. Disponible en: https://www.cytognos.com/products/lst-lymphoid-screening-tube/

29. SH Swerdlow et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Vol. 2. 2017.

30. Bossuyt X, Marti GE, Fleisher TA. Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. Cytometry. 1997;30(3):124-33.

31. Chronic Lymphoproliferative Disorders [Internet]. Cytognos, S.L. [citado 7 de mayo de 2022]. Disponible en: https://www.cytognos.com/euroflow-databases/resources/chronic-lymphoproliferative-disorders/

ANEXOS

ANEXO 1: Formato de Consentimiento Informado

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO EN INVESTIGACIÓN

Título del proyecto: ESTANDARIZACION DEL CITOMETRO NOVOCYTE ADVANTEON PARA LA IDENTIFICACIÓN AUTOMATIZADA DE LINFOCITOS EMPLEANDO LA BASE DE DATOS EUROFLOW, EN UN LABORATORIO PRIVADO DE LIMA, 2021

Tesistas: Sany Naína Gonzáles Saravia.

Descripción:

Usted ha sido invitado a participar en una investigación sobre: Ajustes de instrumento en el citómetro Novocyte Advanteon para el uso de base de datos automatizada. Esta investigación es realizada por: Bach. Sany N. Gonzales Saravia, para obtener el grado de Lic. En Tecnología Médica por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

El propósito de esta investigación es establecer los ajustes en el citómetro Novocyte Advanteon de acuerdos a recomendaciones estandarizadas para que sean compatibles con la base de datos automatizadas. Para lo cual necesitamos muestras de sangre periférica de donantes voluntarios sanos.

Usted fue seleccionado para participar en esta investigación como donante sano, ya que declara no tener diagnóstico previo de linfoma o inmunodeficiencias. Se espera que en este estudio participen 25 personas como voluntarios. Las muestras de los donantes sanos serán marcadas con un kit de LST (Cytognos) para evaluar los ajustes realizados en el instrumento y compararlo con la base de datos.

Si acepta participar en esta investigación, se le solicitará asistir al área de toma de muestra del laboratorio Cytometric Bioservices SAC para la extracción un volumen de sangre de 3 mililitros (1 tubo EDTA), el cual será recogido por los investigadores en un tubo EDTA, mediante punción venosa del brazo.

Riesgos y beneficios

Los riesgos asociados a la toma de muestra pueden ser dolor moderado y pasajero, así como sangrado o hematoma en la zona de punción. Para prevenir el sangrado mantener presionado el algodón en la zona de punción al menos por 5 minutos. En caso de hematomas colocar compresas tibias en el área.

Participar en el estudio no le conlleva ningún beneficio monetario, la participación es voluntaria no remunerada.

Requisitos

El paciente será programado para asistir al laboratorio de toma de muestra previa coordinación en una fecha y hora determinada, de acuerdo a su disponibilidad. Asistirá en ayunas, el tiempo aproximado que se requiere para la toma de muestra es de 10 minutos aproximadamente.

Confidencialidad

Las respuestas, así como los datos brindados y lo observado en el análisis de las muestras serán almacenados en un ambiente con acceso restringido. Las únicas personas con acceso a la información brindada serán los investigadores. En los datos publicados no se incluirán datos personales, nadie fuera del estudio conocerá de su participación.

Incentivos

La participación es voluntaria y no será remunerada. La participación no generará gastos para el participante, más que transporte al laboratorio.

Derechos

Si ha leído este documento y ha decidido participar, por favor entienda que su participación es totalmente voluntaria y que usted tiene derecho a abstenerse de participar o retirarse del estudio en cualquier momento, sin ninguna penalidad. También tiene derecho a no contestar alguna pregunta en particular.

Si tiene alguna duda o desea más información sobre esta investigación, por favor comuníquese con: Sany Gonzales Saravia o Lic. TM Julia Moya al número +51 931825375.

Su firma en este documento significa que ha decidido participar después de haber leído y discutido la información presente en el siguiente formato de consentimiento.

He leído la información proporcionada. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación como donante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte de ninguna manera. Además, confirmo no tener diagnóstico de linfomas e inmunodeficiencias previo.

Nombre del participante:
.....

Firma del participante:
……

DNI:
…….

Fecha:
……..

**Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de consentimiento informado.*

Anexo 2: Constancia de verificación de Expertos

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica

Constancia de Verificación por Expertos

Proyecto: Estandarización del citómetro Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos en un laboratorio privado de lima, 2021

Tesista: Sany Naína Gonzáles Saravia

Estimado: Dr. Richard Dyer Velarde-Álvarez

Tengo el agrado de dirigirme a Ud. para saludarlo cordialmente y a la vez manifestarle que, conscientes de su trayectoria y experiencia profesional, solicitarle tenga el bien de revisar y verificar el Instrumento de la tesis para obtener el grado de Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

INSTRUCCIONES

A continuación, se presentan 6 criterios, los cuales permitirán obtener su apreciación del instrumento de recolección de datos, siendo esto de gran importancia ya que nos permitirá realizar los ajustes correspondientes y obtener un instrumento más confiable.

Nº	CRITERIOS	SI	NO	Señale la pregunta o el ítem que debe modificarse
1	El instrumento propuesto responde al problema de investigación.	X		
2	Los ítems planteados son comprensibles y adecuados para el estudio	X		
3	Los ítems permitirán lograr los objetivos del estudio.	X		
4	Las preguntas o ítems responden a la operacionalización de las variables.	X		
5	El instrumento facilitará el procesamiento y análisis de datos	X		
6	Agregaría algún ítem al instrumento.		X	

Finalmente, completar el siguiente cuadro de conformidad en relación a sus apreciaciones:

CONFORMIDAD DEL INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS			
Nombre del experto: RICHARD DYER VELARDE-ÁLVAREZ	Aprobado	Aprobado con observaciones	No aprobado
Sello y firma del Experto: CITOMETRIC BIOSERVICES S.A.C. RICHARD DYER VELARDE-ALVAREZ DIRECTOR MEDICO MEDICO ANATOMO PATOLOGO CMP 32 RNE 11669	X	Observaciones:	

Profesión: MÉDICO CIRUJANO - ANATOMO PATÓLOGO Años de experiencia en el área: 19 AÑOS

Cargo: DIRECTOR MÉDICO Institución: CYTOMETRIC BIOSERVICES S.A.C.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica

Constancia de Verificación por Expertos

Proyecto: Estandarización del citómetro Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos en un laboratorio privado de lima, 2021

Tesista: Sany Naína Gonzáles Saravia

Estimado: Lic. TM César Rivera Orcoapaza.

Tengo el agrado de dirigirme a Ud. para saludarlo cordialmente y a la vez manifestarle que, conscientes de su trayectoria y experiencia profesional, solicitarle tenga el bien de revisar y verificar el Instrumento de la tesis para obtener el grado de Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

INSTRUCCIONES

A continuación, se presentan 6 criterios, los cuales permitirán obtener su apreciación del instrumento de recolección de datos, siendo esto de gran importancia ya que nos permitirá realizar los ajustes correspondientes y obtener un instrumento más confiable.

N°	CRITERIOS	SI	NO	Señale la pregunta o el ítem que debe modificarse
1	El instrumento propuesto responde al problema de investigación.	✓		
2	Los ítems planteados son comprensibles y adecuados para el estudio	✓		
3	Los ítems permitirán lograr los objetivos del estudio.	✓		
4	Las preguntas o ítems responden a la operacionalización de las variables.	✓		
5	El instrumento facilitará el procesamiento y análisis de datos	✓		
6	Agregaría algún ítem al instrumento.		✓	

Finalmente, completar el siguiente cuadro de conformidad en relación a sus apreciaciones:

CONFORMIDAD DEL INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS			
Nombre del experto: CÉSAR RIVERA ORCOAPAZA	**Aprobado** X	**Aprobado con observaciones**	**No aprobado**
Sello y firma del Experto: Lic. César Rivera Orcoapaza, Tecnólogo Médico, CTMP 10651		Observaciones:	

Profesión: Tecnologo Medico

Cargo: Analista

Años de experiencia en el área: 7 años

Institución: Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica

Constancia de Verificación por Expertos

Proyecto: Estandarización del citómetro Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos en un laboratorio privado de lima, 2021

Tesista: Sany Naina Gonzáles Saravia

Estimado: Lic. TM Carlos Jesús Cortez Rodríguez

Tengo el agrado de dirigirme a Ud. para saludarlo cordialmente y a la vez manifestarle que, conscientes de su trayectoria y experiencia profesional, solicitarle tenga el bien de revisar y verificar el Instrumento de la tesis para obtener el grado de Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

INSTRUCCIONES

A continuación, se presentan 6 criterios, los cuales permitirán obtener su apreciación del instrumento de recolección de datos, siendo esto de gran importancia ya que nos permitirá realizar los ajustes correspondientes y obtener un instrumento más confiable.

N°	CRITERIOS	SI	NO	Señale la pregunta o el ítem que debe modificarse
1	El instrumento propuesto responde al problema de investigación.	X		
2	Los ítems planteados son comprensibles y adecuados para el estudio	X		
3	Los ítems permitirán lograr los objetivos del estudio.	X		
4	Las preguntas o ítems responden a la operacionalización de las variables.	X		
5	El instrumento facilitará el procesamiento y análisis de datos	X		
6	Agregaría algún ítem al instrumento.		X	

Finalmente, completar el siguiente cuadro de conformidad en relación a sus apreciaciones:

CONFORMIDAD DEL INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS			
Nombre del experto: CARLOS JESÚS CORTEZ RODRIGUEZ	**Aprobado**	**Aprobado con observaciones**	**No aprobado**
Sello y firma del Experto: Lic. Carlos Jesús Cortez Rodríguez, Tecnólogo Médico, Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, C.T.M.P. 15662	X	Observaciones:	

Profesión: TECNÓLOGO MÉDICO Años de experiencia en el área: 8 años

Cargo: ANALISTA Institución: CYTOMETRIC BIOSERVICES SAC

ANEXO 3: INSTRUMENTO

1. Prueba de lisantes

Criterio 1: Pérdida celular

Muestra	HEMOGRAMA						CITOMETRIA DE FLUJO																							
							FACS LYSING						OPTYLISE C						EXCELLYSE EASY						EXCELLYSE I					
	Leuc. (cel/ul)	L%	M%	N%	E%	B%	Leuc. (cel/ul)	L%	M%	N%	E%	B%	Leuc. (cel/ul)	L%	M%	N%	E%	B%	Leuc. (cel/ul)	L%	M%	N%	E%	B%	Leuc. (cel/ul)	L%	M%	N%	E%	B%
1																														
2																														
3																														
4																														
5																														
6																														
7																														
8																														
9																														
10																														

Criterio 2: Conservación de fluorescencia

	FACS LYSING																OPTYLISE C															
	IFM población positiva								CV población positiva								IFM población positiva								CV población positiva							
Muestra	FITC	PE	Percpcy.5	APC	PECY7	APCcy7	PB	PO	FITC	PE	Percpcy.5	APC	PECY7	APCcy7	PB	PO	FITC	PE	Percpcy.5	APC	PECY7	APCcy7	PB	PO	FITC	PE	Percpcy.5	APC	PECY7	APCcy7	PB	PO
1																																
2																																
3																																
4																																
5																																
6																																
7																																
8																																
9																																
10																																

	EXCELLYSE I																EXCELLISE EASY															
	IFM población positiva								CV población positiva								IFM población positiva								CV población positiva							
Muestra	FITC	PE	Percpcy.5	APC	PECY7	APCcy7	PB	PO	FITC	PE	Percpcy.5	APC	PECY7	APCcy7	PB	PO	FITC	PE	Percpcy.5	APC	PECY7	APCcy7	PB	PO	FITC	PE	Percpcy.5	APC	PECY7	APCcy7	PB	PO
1																																
2																																
3																																
4																																
5																																
6																																
7																																
8																																
9																																
10																																

Criterio 3: Superposición de poblaciones y discriminación de linfocitos del debris

Lisantes	FACS LYSING							OPTYLISE C							EXCELLYSE EASY							EXCELLYSE I						
	Linfocitos			debris			stain index	Linfocitos			debris			stain index	Linfocitos			debris			stain index	Linfocitos			debris			stain index
Muestras	IFM pos	IFM neg	DS neg	IFM pos	IFM neg	DS neg		IFM pos	IFM neg	DS neg	IFM pos	IFM neg	DS neg		IFM pos	IFM neg	DS neg	IFM pos	IFM neg	DS neg		IFM pos	IFM neg	DS neg	IFM pos	IFM neg	DS neg	
1																												
2																												
3																												
4																												
5																												
6																												
7																												
8																												
9																												
10																												

2. Ajuste de voltajes y valores objetivos

		Controles de compensación							
		Fluorescencias del Kit LST							
		FITC	PE	Percp Cy5.5	APC	PECy7	APCC750	PB	OC515
Día 1	Mediana FACS CANTO II								
	Mediana calculada Novocyte Advanteon								
Día 2	Mediana FACS CANTO II								
	Mediana calculada Novocyte Advanteon								
Día 3	Mediana FACS CANTO II								
	Mediana calculada Novocyte Advanteon								

		Rainbow Beads 8 peaks (Espherotec, Lote EAM01)																															
		FITC				PE				PERCPCy5.5				APC				PECY7				APCC750				PB				OC515			
		DIA 1	DIA 2	DIA 3	Promedio	DIA 1	DIA 2	DIA 3	Promedio	DIA 1	DIA 2	DIA 3	Promedio	DIA 1	DIA 2	DIA 3	Promedio	DIA 1	DIA 2	DIA 3	Promedio	DIA 1	DIA 2	DIA 3	Promedio	DIA 1	DIA 2	DIA 3	Promedio	DIA 1	DIA 2	DIA 3	Promedio
Novocyte Advanteon (IFM)	PICO 1																																
	PICO 2																																
	PICO 3																																
	PICO 4																																
	PICO 5																																
	PICO 6																																
	PICO 7																																
	PICO 8																																
Novocyte Advanteon (CV)	PICO 1																																
	PICO 2																																
	PICO 3																																
	PICO 4																																
	PICO 5																																
	PICO 6																																
	PICO 7																																
	PICO 8																																

3. Evaluación de la base de datos

	Poblaciones reconocidas por la base de datos %	Poblaciones en revisión %
Muestra 1		
Muestra 2		
Muestra 3		
Muestra 4		
Muestra 5		
Muestra 6		
Muestra 7		
Muestra 8		
Muestra 9		
Muestra 10		
Muestra 11		
Muestra 12		
Muestra 13		
Muestra 14		
Muestra 15		
Muestra 16		
Muestra 17		
Muestra 18		
Muestra 19		
Muestra 20		
Muestra 21		
Muestra 22		
Muestra 23		
Muestra 24		
Muestra 25		

ANEXO 4: AUTORIZACIÓN INSTITUCIONAL

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica

Señor
Agustín Carlos Alberto Zafra Escobar

Gerente General de Cytometric Bioservices SAC

De mi consideración

Es grato dirigirme a usted y mencionarle que soy bachiller de Tecnología Médica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y actualmente me encuentro desarrollando mi tesis de grado, con título: ESTANDARIZACIÓN DEL CITÓMETRO DE FLUJO NOVOCYTE ADVANTEON PARA EL ANÁLISIS AUTOMATIZADO DE LINFOCITOS EN UN LABORATORIO PRIVADO DE LIMA, 2021. Por lo cual someto a su atenta consideración la presente solicitud para el uso de las instalaciones, reactivos, insumos y equipos de su laboratorio. Así como el uso de equipos e instalaciones de las instituciones con las cuales presenta convenios de cooperación para el desarrollo de proyectos.

Las fechas programadas para el procesamiento de muestras serán de acuerdo a disponibilidad del equipo, el tiempo proyectado para la ejecución de los experimentos es de dos meses aproximadamente. Asimismo, me comprometo a cumplir con las políticas y normas establecidas en su institución.

Si está de acuerdo por favor firme en el formulario adjunto, reconociendo su consentimiento a esta solicitud. Esperando su gentil colaboración con el presente proyecto quedo atenta a su respuesta.

Gracias por su atención
Atte.
Sany Naína Gonzáles Saravia
DNI: 72169438
Cel. 931825375

CYTOMETRIC BIOSERVICES S.A.C
RECIBIDO
Fecha: 5 / 5 / 21
Firma:

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica

SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN EN PROCESOS FORMALES DE INVESTIGACIÓN.

DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL SOLICITANTE

Nombre y apellidos: Sany Naina Gonzáles Saravia

Entidad / Institución: Cytometric Bioservices SAC

Dirección: Av. Del Aire 1308, San Luis, Lima **Teléfono:** (511) 346 2167 **Correo electrónico:** contacto@cytometricbioservices.com

INFORMACION SOBRE LA SOLICITUD

Procedimiento a realizar

1. El solicitante esta interesado en el uso del equipo, instalaciones e insumos de su institución de acuerdo a disponibilidad del mismo para el desarrollo del presente proyecto.
2. El solicitante esta interesado en el uso del equipo e instalaciones del laboratorio Biolab con el cual presenta convenios de cooperación entre instituciones para la ejecución de proyecto.

Servicio: Laboratorio de citometría de flujo

FINALIDAD Y UTILIZACIÓN

Objetivo de la solicitud:
Solicitar la autorización de acceso a sus instalaciones y uso de equipos que involucren el análisis de muestras para citometría de flujo. Asimismo, a través del convenio de cooperación existente entre instituciones como Biolab, solicito el acceso al citómetro e instalaciones de esta entidad, de acuerdo a disponibilidad de las mismas.

Justificación
El objetivo del proyecto es la estandarización del citómetro Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos. Mediante el ajuste de voltajes y selección del lisante adecuado para obtener datos compatibles con la base de datos estandarizada del Software Infinicyt 2.0.

El presente proyecto se busca demostrar que usando equipos e insumos de diferentes marcas se pueden alcanzar resultados semejantes a los descritos en protocolos estandarizados, haciendo posible el uso de herramientas de análisis automatizado con la base de datos del Software Infinicyt, llegando a obtener resultados objetivos en los cuales se puedan apoyar la toma de decisiones diagnósticas. Además, servirá de guía para usuarios de Novocyte Advanteon, así como para usuarios de otras marcas que busquen la estandarización de sus equipos.

Utilización
Los datos obtenidos serán usados en el desarrollo de la tesis para optar por el título de licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

El solicitante se compromete a:

1. Cumplir con el plan y cronograma de trabajo establecido en las áreas que así lo autorizaron.
2. Realizar únicamente los experimentos autorizados.
3. Esta autorización solamente aplica para la realización del trabajo referenciado arriba. Si se requiere ampliación, deberá nuevamente solicitar el correspondiente permiso.
4. Mantener la confidencialidad y la seguridad de la información obtenida, haciendo uso de esta únicamente para lo expuesto en esta solicitud
5. Para presentaciones públicas de la información recolectada se darán los créditos correspondientes a los laboratorios en mención.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica

Firma del solicitante:

Nombre: **Sany Naina Gonzáles Saravia**

RESPUESTA A LA SOLICITUD:

Tras la verificación de lo expuesto en esta solicitud en relación con el uso de la información, el procedimiento propuesto y la pertinencia del mismo, esta solitud es:

Autorizada: X **No autorizada:** ____

Observaciones: .....

.....

En constancia de lo anterior firma:

AGUSTIN CARLOS ALBERTO ZAFRA ESCOBAR
GERENTE GENERAL
CYTOMETRIC BIOSERVICES S.A.C.
20520580663

Fecha: 6/5/2021
Nombre: **Agustin Carlos Alberto Zafra Escobar**
Gerente General de **Cytometric Bioservices SAC**

cytognos

LST
Lymphoid Screening Tube
Panel

EuroFlow

Pacific Blue™	OC515™	FITC	PE	PerCP-Cyanine 5.5	PE-Cyanine7	APC	APC-C750™
CD20+ CD4	CD45	CD8+ SmIgλ	CD56+ SmIgK	CD5	CD19+ TCRγδ	CD3	CD38

Ref: CYT-LST

CE
IVD

Para Diagnóstico In Vitro

LOS VIALES DE LST CONTIENEN REACTIVOS LIOFILIZADOS. LEA ATENTAMENTE LAS SIGUIENTES INSTRUCCIONES PARA RECONSTITUIRLOS:

El formato liofilizado del kit LST mantiene la estabilidad de la mezcla de anticuerpos que lo componen. Se recomienda reconstituir **cada vial** del reactivo con **300 µL de agua destilada**.
Mezclar bien cada vial reconstituido en un agitador tipo "roller" durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente antes de su utilización.
Centrifugar el vial reconstituido antes de utilizarlo.
El volumen no utilizado de los viales reconstituidos es estable durante un mes desde la fecha de reconstitución si se conserva en oscuridad entre 2-8ºC.

LOS TUBOS DE COMPENSACIÓN CONTIENEN REACTIVOS LIOFILIZADOS. LEA ATENTAMENTE LAS SIGUIENTES INSTRUCCIONES PARA RECONSTITUIRLOS:

Para reconstituir los **tubos de compensación liofilizados**, **añadir directamente al tubo el volumen correspondiente de la muestra** destinada a la compensación: sangre periférica (SP) o esferas. **Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y seguir con el protocolo habitual**: EuroFlow™ standard operating protocol (SOP) en el caso de SP (www.euroflow.org) o protocolo del fabricante en el caso de las esferas.

USO PROPUESTO
El tubo para la evaluación de poblaciones linfocitarias (LST, Lymphoid Screening Tube) es un kit que contiene una mezcla de 12 anticuerpos diseñado para la detección de poblaciones linfoides maduras aberrantes de línea B, T y NK por citometría de flujo. Este tubo de 8 colores puede utilizarse para evaluar diversas sospechas de afecciones clínicas, como presencia de linfocitosis, nódulos linfoides aumentados, esplenomegalia, componentes monoclonales en suero, citopenias sin causa aparente, etc. [1]. Este kit debe ser utilizado por personal cualificado en citometría de flujo.

PRINCIPIOS DEL ENSAYO
La citometría de flujo es una tecnología que permite evaluar simultáneamente diferentes características de una sola célula. Los citómetros de flujo utilizan un enfoque hidrodinámico o acústico para presentar células individualmente a uno o más haces de láser. Cuando las células son interceptadas por la luz, un conjunto de detectores recupera señales de dos tipos: las generadas por luz dispersa (FSC/SSC), que reflejan principalmente el tamaño celular y la complejidad interna, y las relacionadas con la emisión de luz de los fluorocromos cuando las células están marcadas. Las señales recuperadas son amplificadas y se convierten en señales eléctricas para ser trazadas. Cuando se añade el reactivo a la muestra, los anticuerpos marcados con fluorocromos presentes en los reactivos se unen de forma específica a los antígenos frente a los que están dirigidos, permitiendo la detección por citometría de flujo de los diferentes subconjuntos de células.
La población de eritrocitos, que podría dificultar la detección de la población de interés, se elimina utilizando una solución lisante.

cytognos

RESUMEN Y EXPLICACIÓN
La detección de linfocitos maduros clonales fenotípicamente aberrantes tiene un papel relevante en el diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC). Los eventos clonogénicos tienen como resultado la expansión y acumulación de linfocitos de fenotipo maduro, los cuales cuentan con una ventaja proliferativa y/o de supervivencia sobre sus homólogos normales.
El kit LST reconoce mediante citometría de flujo los antígenos CD45, CD3, CD56, CD4, CD8, CD5, CD20, CD19, TCRγδ, CD38 y cadenas ligeras kappa y lambda, presentes en las diferentes subpoblaciones de linfocitos y células plasmáticas; por tanto, puede ser utilizado en estudios de caracterización inmunofenotípica de los linfocitos y células plasmáticas. Estos estudios son ampliamente usados para la caracterización y seguimiento de diferentes enfermedades hematológicas [2-5].

COMPOSICIÓN DEL REACTIVO
El kit LST contiene suficiente volumen para 25 determinaciones distribuido en viales liofilizados de 5 determinaciones cada uno y contiene:

- **5 viales de 5 test cada uno con la siguiente mezcla liofilizada de anticuerpos para marcaje de superficie:**
  - Anticuerpo anti CD4/CD20-Pacific Blue™ Humano, clon: RPA-T4; 2H7, isotipo: IgG1/IgG2b
  - Anticuerpo anti CD45-OC515™ Humano, clon: GA90, isotipo: IgG2a.
  - Anticuerpo anti CD8/SmIgλ-FITC Humano, clon: UCHT-4/policlonal, isotipo: IgG2a/----.
  - Anticuerpo anti CD56/SmIgK-PE Humano, clon: C5.9/ policlonal, isotipo: IgG2b/----.
  - Anticuerpo anti CD5-PerCP-Cyanine 5.5 Humano, clon: L17F12, isotipo: IgG2a.
  - Anticuerpo anti CD19/ TCRγδ-PE-Cyanine7 Humano, clon: SA287/ 11F2, isotipo: IgG1/IgG1.
  - Anticuerpo anti CD3-APC Humano, clon: UCHT-1, isotipo: IgG1.
  - Anticuerpo anti CD38-APC-C750™ Humano, clon: LD38, isotipo: IgG1.

Fluorocromo	Pacific Blue™		OC515™	FITC		PE		PerCP-Cyanine5.5	PE-Cyanine7		APC	APC-750™
Marcador	CD20	CD4	CD45	CD8	SmIgλ	CD56	SmIgK	CD5	CD19	TCRγδ	SmCD3	CD38
Clon	2H7	RPA-T4	GA90	UCHT-4	Policlonal	C5.9	Policlonal	L17F12	SA287	11F2	UCHT-1	LD38
Isotipo	IgG2b	IgG1	IgG2a	IgG2a		IgG2b		IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Reactividad	Cél. B	Cél. T colab.	Leucocitos	Cél. T citotox.	Cadena Ligera Ig Lambda	Cél. NK	Cadena Ligera Ig Kappa	Cél. T	Cél. B	Cél. T	Cél. T maduras	Cél. Plasmáticas y otras

- **4 tubos de compensación liofilizados** de 1 test cada uno para los conjugados CD5-PerCP-Cyanine 5.5, CD45-OC515™, CD19/TCRγδ-PE-Cyanine7 y CD38-APC-C750™.

Todos los componentes contienen 0,09% (p/v) de azida sódica (NaN_3). Los reactivos no son considerados estériles.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO
El reactivo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se almacena a una temperatura de 2-8ºC. El reactivo no se debe congelar ni exponer a luz directa durante el almacenamiento o la incubación con las muestras. Mantener los viales en un lugar seco. Una vez abiertos, los viales deben almacenarse en posición vertical para evitar posibles derrames.

ADVERTENCIAS Y RECOMENDACIONES
1. Para uso en diagnóstico *in vitro*.
2. Alteraciones en la apariencia del producto, como la presencia de precipitados o cambios de color, son indicativos de inestabilidad o deterioro. En esas condiciones el reactivo no debe ser utilizado.
3. Contiene azida sódica 0,09% (p/v) (CAS-Nr. 26628-22-8) como conservante, pero aún así se debe tener cuidado para evitar la contaminación bacteriana del reactivo puesto que en esas circunstancias podrían obtenerse resultados incorrectos.
   Indicaciones de peligro:
   H302 Nocivo en caso de ingestión
   Indicaciones de prudencia:
   P264 Lavarse concienzudamente tras la manipulación.
   P270 No comer, beber ni fumar durante su utilización.
   P301+P312 En caso de ingestión, llamar a un centro de información toxicológica o a un médico en caso de malestar.
   P301+P330 En caso de ingestión, enjuagarse la boca.
   P501 Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con la normativa local, regional, nacional o internacional.
4. Todas las muestras biológicas y los materiales con los que estén en contacto deben considerarse como riesgos biológicos. Se recomienda su manipulación como sustancias capaces de transmitir infecciones [6] y desecharse con las precauciones reglamentarias establecidas para este tipo de productos. Se recomienda su manipulación con ropa y guantes protectores apropiados y su uso por personal suficientemente cualificado para las técnicas descritas. Evitar el contacto de las muestras con la piel y las membranas mucosas, en caso de contacto lavar inmediatamente con abundante agua.

5. La utilización del reactivo con diluciones, tiempos de incubación o temperaturas diferentes de los recomendados puede provocar resultados erróneos. Cualquiera de estos cambios deben ser validados por el usuario.
6. Cualquier incidente grave relacionado con el producto debe comunicarse a Cytognos, así como a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario.

PROCEDIMIENTO

Material requerido pero no suministrado

- Citómetro de flujo equipado con 3 laser (8 colores o más, como Omnicyt™) y el hardware y software adecuado.
- Tubos de ensayo adecuados para la adquisición de las muestras en el citómetro de flujo utilizado. Habitualmente se utilizan tubos con fondo redondo de 5 mL, 12x75 mm
- Pipeta automática y puntas
- Tubos cónicos de 10 mL
- Cronómetro
- Pipeta Pasteur o sistema de vacío
- Agitador Vortex
- Centrífuga
- Solución lisante de eritrocitos que contiene fijador
- Tampón de lavado: solución salina tamponada con fosfato (PBS) con NaN_3 0,09% (p/v), albúmina sérica bovina (BSA) 0,2 % (p/v) y Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 2mM.
- Tampón de adquisición: PBS, BSA 0,2 % (p/v) y EDTA 2mM (sin NaN_3).

Preparación

Las muestras se deben recoger en tubos tratados con anticoagulante disponibles en el mercado. Se recomienda utilizar EDTA [7]. Todos los pasos indicados a continuación deben realizarse a temperatura ambiente (RT).

Procedimiento recomendado:

1. **El tubo LST incluye marcaje de Inmunoglobulinas (Ig) de la superficie de la membrana celular (Sm). Las muestras deben lavarse tres veces para eliminar las proteínas séricas solubles (pasos 1a-1q) para evitar la tinción no específica.**
   a. Pipetear 300 µL de la muestra en un tubo de análisis.
   b. Añadir 6 mL de tampón de lavado.
   c. Mezclar bien.
   d. Llenar el tubo hasta 10 mL (agregando tampón de lavado).
   e. Centrifugar durante 5 minutos a 540 g.
   f. Retirar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o sistema de vacío, pero manteniendo intacto el precipitado celular.
   g. Añadir 6 ml de tampón de lavado al precipitado celular.
   h. Mezclar bien.
   i. Llenar el tubo hasta 10 mL (agregando tampón de lavado).
   j. Centrifugar durante 5 minutos a 540 g.
   k. Retirar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o sistema de vacío, pero manteniendo intacto el precipitado celular.
   l. Añadir 6 mL de tampón de lavado al precipitado celular.
   m. Mezclar bien.
   n. Llenar el tubo hasta 10 mL (agregando tampón de lavado).
   o. Centrifugar durante 5 minutos a 540 g.
   p. Retirar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o sistema de vacío sin alterar el precipitado celular.
   q. Resuspender el precipitado celular en 300 µL de tampón de lavado.

2. Añadir 50 µL de la combinación de anticuerpos reconstituida sobre 50 µL de precipitado celular resuspendido en el paso 1q.
3. Mezclar bien.
4. Incubar 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
5. Añadir 2 mL de una solución lisante de eritrocitos con fijador.
6. Mezclar bien.
7. Incubar durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
8. Centrifugar durante 5 minutos a 540 g.
9. Retirar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o sistema de vacío manteniendo intacto el precipitado celular, dejando un volumen residual aproximado de 50 µL en cada tubo.
10. Añadir 2 mL de tampón de lavado al precipitado celular.
11. Mezclar bien.
12. Centrifugar durante 5 minutos a 540 g.
13. Retirar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o sistema de vacío manteniendo intacto el precipitado celular, dejando un volumen residual aproximado de 50 µL en cada tubo.
14. Resuspender el precipitado celular con tampón de adquisición:
    - 320 µL para adquirir en el Omnicyt ™

    - 200 µL para otros citómetros de flujo
15. Adquirir las células inmediatamente tras el marcaje o almacenar a 4ºC (durante 1 h como máximo) hasta que se mida en el citómetro de flujo.
16. Adquirir la muestra a velocidad de flujo media.

Recomendaciones importantes

Para obtener resultados óptimos, es necesario seguir el Protocolo Operativo Estándar (SOP) de EuroFlow para la configuración del Citómetro [8]. Encontrará una guía completa en la web www.euroflow.org, que incluye recomendaciones para el ajuste de FSC, SSC y los ajustes de voltaje de los PMT, compensación y supervisión del rendimiento del instrumento.

Análisis por citometría de flujo

El análisis de los ficheros marcados con el kit LST puede resultar complejo a la hora de definir las ventanas y regiones de análisis de forma manual, puesto que se detectan distintas poblaciones celulares en la misma fluorescencia. Cytognos recomienda el uso del software de análisis Infinicyt™, que es capaz de guardar patrones de expresión conocidos (Imagen de Referencia) y almacenar estrategias de análisis para ser aplicadas en serie a otras muestras utilizando siempre el mismo criterio. Encontrará información completa sobre Infinicyt™ en la página web: www.infinicyt.com

Se recomienda seguir las siguientes indicaciones para el análisis de los archivos de muestras marcadas con el kit LST:

1. Seleccionar las células T (CD3+) como primera población a identificar. El kit LST incluye el anticuerpo CD3-APC como único marcador que emite en esa fluorescencia, por lo que la selección de células T es inequívoca.
2. Sobre la población de células T, seleccionar e identificar las subpoblaciones de células T usando los otros marcadores de célula T incluidos en la mezcla (CD4-Pacific Blue™, CD8-FITC, TCRγδ, etc.).
3. Una vez que las células T se han clasificado, es recomendable no visualizar esas poblaciones en la pantalla de análisis y continuar con el análisis de las células B.
4. La población de células B puede identificarse entonces fácilmente en función de la expresión positiva de los marcadores CD19 y CD20, puesto que los otros marcadores conjugados con este fluorocromo no interferirán en el análisis si las células T no están visibles en el DotPlot bidimensional (2DDotPlot).
5. Sobre la población de células B, seleccionar e identificar las subpoblaciones de células B usando los otros marcadores de célula B incluidos en la mezcla de anticuerpos (SmIgλ-FITC, SmIgκ-PE).
6. Una vez que las células B y T han sido clasificadas, se recomienda no visualizar esas poblaciones en la pantalla de análisis y continuar con el análisis de las células NK.
7. Las células NK pueden entonces identificarse fácilmente en base a su expresión CD56 positiva, puesto que las células positivas para el antígeno SmIgκ no se muestran en el 2DDotPlot.
8. La población de células plasmáticas se puede identificar mediante su expresión positiva de CD38.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Especificidad

- ✓ El antígeno CD3 se expresa en la superficie de timocitos maduros y de células T en sangre periférica.
- ✓ El antígeno CD4 se expresa en una subpoblación de células T en sangre periférica, en la mayoría de los timocitos y en algunas células malignas de origen T. Monocitos y macrófagos presentan una expresión débil de CD4. Los linfocitos B normales y granulocitos no expresan el antígeno CD4 en superficie.
- ✓ El antígeno CD8 está presente en la subpoblación de linfocitos T en sangre periférica, en el 60% de timocitos y en un número limitado de enfermedades de origen T. Los linfocitos B normales, monocitos y granulocitos no expresan el antígeno CD8 en superficie.
- ✓ El antígeno CD19 se expresa en la superficie de las células B tanto normales como neoplásicas y no se expresa ni en células T, ni en monocitos ni en granulocitos.
- ✓ El anticuerpo policlonal anti-Cadenas Ligeras Kappa reacciona con las cadenas ligeras libres Kappa, así como con las cadenas Kappa de las moléculas de inmunoglobulina intactas.
- ✓ El anticuerpo policlonal anti-Cadenas Ligeras Lambda reacciona con las cadenas ligeras libres Lambda, así como con las cadenas Lambda de las moléculas de inmunoglobulina intactas.
- ✓ El antígeno CD56 se expresa en las células NK (activadas y en reposo) en sangre periférica y además en una subpoblación de células T CD3+.
- ✓ El antígeno CD5 se expresa en linfocitos T y no en células NK. La expresión del antígeno CD5 es determinante para la caracterización de varias enfermedades hematológicas.
- ✓ El receptor de células Tγδ (TCRγδ) se expresa en una subpoblación de células T de sangre periférica y en timocitos.
- ✓ El antígeno CD38 se expresa en células plasmáticas, células T activadas, monocitos, células dendríticas y macrófagos. El estudio de la expresión de CD38 ayuda a la caracterización de varias enfermedades hematológicas.
- ✓ El antígeno CD20 está presente en la superficie de linfocitos B y no está presente en células plasmáticas.
- ✓ El antígeno CD45 se expresa en leucocitos humanos incluyendo linfocitos, monocitos, granulocitos y eosinófilos. Eritrocitos, plaquetas y células de origen no hematopoyético no expresan el antígeno CD45.

Valores esperados

Cada laboratorio debe establecer sus valores normales de referencia para las poblaciones linfocitarias, teniendo en cuenta que estos valores pueden variar dependiendo de la edad, el sexo o la raza. Los rangos de referencia para las diferentes poblaciones linfocitarias se detallan en la siguiente tabla y son expresadas como un porcentaje de la población de linfocitos. Los datos corresponden a n = 69 muestras de donantes de sangre sanos adquiridas en un citómetro BD FACSCanto II y analizadas con el software Infinicyt™ (Cytognos S.L., Salamanca, España).

Población celular	Población de referencia	Media (%) ± SD (rango)	CV (%)
Linfocitos	Leucocitos	27.55 ± 7.66 (14.91 - 58.71)	27.8
Células B	Linfocitos	10 ± 3.32 (0.96 - 18.3)	33.17
Células B Kappa	Células B	59.43 ± 5.25 (49.79 - 77.89)	8.83
Células B Lambda	Células B	40.57 ± 5.25 (22.11 - 50.21)	12.94
Células T	Linfocitos	80.92 ± 6.46 (64.3 - 92.72)	7.98
Células T CD4+	Células T	63.24 ± 11.87 (32.46 - 79.42)	18.77
Células T CD8++	Células T	30.23 ± 9.51 (13.65 - 60.57)	31.46
Células TCRγδ+	Células T	1.28 ± 0.47 (0.83 - 1.72)	36.86
Células NK	Linfocitos	9.08 ± 5.84 (1.02 - 23.56)	64.37

La siguiente tabla muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) esperada de los diferentes anticuerpos incluidos en el kit LST para cada población diana. Los datos corresponden a n = 69 muestras de donantes de sangre sanos medidas en un citómetro BD FACSCanto II y analizadas con el software Infinicyt™.

Anticuerpo	Fluorocromo	Población celular	Media (IMF) ± SD (rango)	CV (%)
KAPPA	PE	Células B-CD20+/CD19+/CD3-	35932,05 ±14492,92 (11453,54-62583,85)	40,33
LAMBDA	FITC	Células B-CD20+/CD19+/CD3-	14508,00±2872,06 (8304,31-22974,82)	19,80
CD3	APC	Células T-CD3+/CD4+	41327,148539,73 (21726,62-64684,06)	20,66
CD4	Pacific Blue™	Células T-CD3+/CD4+	6308,25±702,35 (4839,15-7782,59)	11,13
CD5	PerCP-Cyanine5.5	Células T-CD3+/CD4+	17369,24±3751,54 (7340,00-27866,14)	21,60
CD8	FITC	Células T-CD3+/CD8++	16727,48±1862,44 (13265,94-21821,61)	11,13
TCRγδ	PE-Cyanine7	Células T-TCRγδ+/CD3++	3792,11±406,43 (3281,41-4268,73)	10,72
CD19	PE-Cyanine7	Células B-CD20+	17288,82±2050,09 (13570,84-21952,09)	11,86
CD20	Pacific Blue™	Células B-CD19+	18524,62±3411,86 (13008,73-27726,78)	18,42
CD56	PE	Células NK CD56+/CD3-/CD19-	5712,40±1418,14 (3330,04-10184,72)	24,83
CD38	APC-C750™	Células NK CD56+/CD3-/CD19-	2190,42±1435,50 (414,48-5901,26)	65,54
CD45	OC515™	Linfocitos CD45+/SSC^{debil}	4502,99±1044,62 (2922,78-7027,39)	23,20

Exactitud

Los porcentajes obtenidos de las poblaciones linfocitarias mayoritarias con el kit de screening LST de Cytognos fueron comparados con los resultados obtenidos con la combinación de anticuerpos propuesta por el Consorcio EuroFlow [1]. La comparación de las n=69 muestras procesadas con ambas combinaciones muestran que el kit LST puede ser considerado equivalente. La siguiente tabla indica que los resultados en muestras de sangre periférica son equivalentes en términos de porcentajes de las diferentes poblaciones linfocitarias. Los datos fueron analizados con el software Infinicyt™.

Población celular	Población de referencia	Media de la combinación control (%) ± SD (rango)	Media de LST Cytognos (%) ± SD (rango)	Diferencias en la media (%)	CV Control (%)	CV Cytognos (%)	p-valor*
Linfocitos	Leucocitos	26.32 ± 10.27 (3.07 - 54.1)	27.55 ± 7.66 (14.91 - 58.71)	1.24	39.03	27.80	0.33
Células B	Linfocitos	11.80 ± 8.59 (0.87 - 71.26)	10.00 ± 3.32 (0.96 - 18.3)	1.81	72.75	33.17	0.06
Células B-Kappa	Células B	58.66 ± 4.82 (49.16 - 81.37)	59.43 ± 5 .25 (49.79 - 77.89)	0.77	8.22	8.83	0.21
Células B-Lambda	Células B	41.34 ± 4.82 (18.63 - 50.84)	40.57 ± 5.25 (22.11 - 50.21)	0.77	11.66	12.94	0.21
Células T	Linfocitos	78.05 ± 11.85 (0.04 - 90.15)	80.92 ± 6.46 (64.3 - 92.72)	2.87	15.18	7.98	0.05
Células T-CD4+	Células T	62.52 ± 9.94 (41.34 - 81.79)	63.24 ± 11.87 (32.46 - 79.42)	0.72	15.91	18.77	0.50
Células T-CD8++	Células T	32.38 ± 8.72 (14.53 - 55.83)	30.23 ± 9.51 (13.65 - 60.57)	2.15	26.93	31.46	0.06
Células T-TCRγδ+	Células T	1.67 ± 0.45 (1.06 - 2.14)	1.28 ± 0.47 (0.83 - 1.72)	0.39	26.88	36.86	0.13
Células NK	Linfocitos	11.28 ± 10.24 (1.81 - 70.34)	9.08 ± 5.84 (1.02 - 23.56)	2.20	90.83	64.37	0.07

*No hay diferencias significativas entre los dos grupos (p≥0.05)

Repetitividad

Se marcaron 12 muestras diferentes de sangre periférica de donantes sanos con dos lotes distintos del kit LST. Cada par de datos se analizó para evaluar las diferencias en IMF de los diferentes anticuerpos incluidos en el kit LST en ambos lotes. Los datos se analizaron con el software Infinicyt ™.

Anticuerpo	Fluorocromo	Población celular	Lote	Media IMF	% Diferencias IMF	SD	CV (%)
KAPPA	PE	Células B CD20+/CD19+/CD3-	1	36009.62	0.07	12127.24	33.68
			2	35984.85		16158.21	44.90
LAMBDA	FITC	Células B CD20+/CD19+/CD3-	1	14507.85	19.50	1968.75	13.57
			2	12140.87		1762.58	14.52
CD3	APC	Células T CD3+/CD4+	1	34912.94	17.33	5394.38	15.45
			2	42230.31		6058.07	14.35
CD4	Pacific Blue™	Células T CD3+/CD4+	1	6281.01	9.96	531.08	8.46
			2	5712.34		811.51	14.21
CD5	PerCP-Cyanine5.5	Células T CD3+/CD4+	1	15954.75	3.31	4790.47	30.03
			2	16501.47		3628.75	21.99
CD8	FITC	Células T CD3+/CD8++	1	16330.59	1.37	1741.51	10.66
			2	16110.34		2005.01	12.45
TCRγδ	PE-Cyanine7	Células T TCRγδ+/CD3++	1	3937.12	8.36	3191.39	81.06
			2	3633.23		310.37	8.54
CD19	PE-Cyanine7	Células B CD19+	1	18160.62	11.30	2119.24	11.67
			2	16317.53		1793.41	10.99
CD20	Pacific Blue™	Células B CD20+	1	17311.79	5.65	2716.58	15.69
			2	16386.69		2350.65	14.34
CD56	PE	Células NK CD56+/CD3-/CD19-	1	5472.48	3.62	846.04	15.46
			2	5281.33		1237.49	23.43
CD38	APC-C750™	Células NK CD56+/CD3-/CD19-	1	2065.67	38.06	1195.14	57.86
			2	1496.22		1073.34	71.74
CD45	OC515™	Linfocitos CD45+/SSC^{debil}	1	3898.54	16.69	855.39	21.94
			2	4679.73		976.00	20.86

LIMITACIONES

- Es recomendable adquirir en el citómetro las muestras teñidas lo antes posible para optimizar los resultados, en caso contrario podrían marcarse de forma inespecífica células no viables. La exposición prolongada a reactivos líticos puede producir la degradación de los leucocitos y la pérdida de células de la población de interés.
- La presencia de glóbulos rojos nucleados y concentraciones anormales de proteína o hemoglobinopatías pueden dar lugar a la lisis incompleta de eritrocitos. Estas condiciones pueden dar lugar a recuentos celulares falsamente bajos puesto que los eritrocitos no lisados pueden ser contados como linfocitos.
- Los resultados obtenidos por citometría de flujo pueden ser erróneos si el láser del citómetro no está perfectamente alineado o si los diagramas usados para el análisis no son los adecuados.
- Es importante comprender el patrón normal de expresión de este antígeno y su relación con la expresión de otros antígenos relevantes con el fin de realizar un análisis adecuado [1-5, 10, 11].

CONTROL DE CALIDAD

- Para obtener resultados óptimos se recomienda verificar la precisión de las pipetas y que el citómetro está correctamente calibrado.
- Los fluorocromos usados en citometría emiten a distintas longitudes de onda, pero tienen cierto solapamiento espectral que debe corregirse mediante compensación electrónica.
- La fabricación de este producto sigue las normas de producción y los sistemas de calidad en conformidad con la norma ISO 13485:2016.

BIBLIOGRAFÍA

1. Van Dongen JJM, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia. 2012 Sep. 26(9):1908-75.
2. Sanchez ML, et al. Incidence of phenotipic aberrations in a serie of 467 patients with B chronic lymphoprolipherative disorders: basis for the design of specific four color stainnings to be used for minimal residual disease investigation. Leukemia. 2002 Aug. 16(8): 1460-1469.
3. Davis BH, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. Citometry Part B. 2007. 72B:S5–S13.
4. Ruiz-Argüelles A, et al. Report on the second Latin American consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. Cytometry Part B. 2006 Jan. 70B:39–44.
5. Stetler-Stevenson M. H43-A2 Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline, 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA; 2007.
6. Protection of Laboratory Workers from occupationally acquired infections. Second edition; approved guideline .2001. Villanova PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document M29-A2.
7. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture- approved standard; 5th edition. 2003. Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H3-A5.
8. Kalina, T, et al. EuroFlow standardization of flow cytometry instrument settings and immunophenotyping protocols. Leukemia. 2012 Sep. 26(9): 1986-2010.
9. Clinical applications of flow cytometry: Quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline 1998. Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H42-A.
10. Fukushima PI et al. Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression in evaluation of specimens for B-cell neoplasia. Cytometry (Communications in clinical Cytometry). 1996 Dec. 26: 243-252.
11. Braylan RC, et al. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. Cytometry. 2001 Feb. 46(1):23-7.

GARANTÍA

Este producto está garantizado sólo en cuanto a su conformidad con la cantidad y el contenido indicados en la etiqueta. No hay otras garantías más allá de lo indicado en la etiqueta del producto. La única responsabilidad de Cytognos se limita a la sustitución del producto o el reembolso del precio de compra.

EXPLICACIÓN DE SÍMBOLOS

	[illegible]
REF	[illegible]
LOT	[illegible]
	[illegible]
	[illegible]
	[illegible]
	[illegible]
IVD	[illegible]
	[illegible]
	[illegible]

PRODUCIDO POR

CYTOGNOS S.L.
Polígono La Serna, Nave 9
37900 Santa Marta de Tormes
Salamanca (España)
Teléfono: + 34-923-125067
Fax: + 34-923-125128
Información de pedidos: admin@cytognos.com
Información técnica: support@cytognos.com
www.cytognos.com

Pacific Blue™. Este producto se proporciona bajo una licencia de propiedad intelectual de la empresa Life Technologies. La compra de este producto otorga al comprador el derecho intransferible de utilizar el producto comprado y sus componentes solo para la identificación, puesta en escena, determinación de predisposición, diagnóstico, pronóstico, monitoreo o tratamiento de enfermedades humanas. Para obtener información sobre la compra de una licencia del producto para fines distintos al diagnóstico, contacte con la empresa Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008 USA o outlicensing@lifetech.com.

ANEXO 6: INSERTO RAINBOW BEADS

Spherotech Inc.
27845 Irma Lee Circle
Lake Forest, Illinois 60045-5100
Tel : (847) 680 8922
Fax : (847) 680 8927
http://www.spherotech.com

TECHNICAL DATA

PRODUCT: SPHERO™ Rainbow Calibration Particles, 8 Peaks, 3.0-3.4 µm

CAT. NO.: RCP-30-5A (EuroFlow™)

LOT NO.: EAM01

SIZE: 5 mL

CONCENTRATION: 1 X 10^7 particles/mL

STORAGE BUFFER: Deionized water with 0.02% Sodium Azide and 0.01% NP40

STORAGE TEMP.: Stable at room temperature. Store between 2 and 8° C after first use.

CAUTION: Do not freeze. Protect from light.

DESCRIPTION: This product contains a mixture of 3.4 µm Rainbow Particles in **eight** different fluorescent intensities. Every Rainbow particle contains a mixture of fluorophores that enable the Rainbow particles to be excited at any wavelength from 365 to 650 nm.

NOTE: Shake vigorously or vortex briefly before use. Inclusion of a small amount of detergent in the diluent will help to increase the number of singles. Diluted Particles can be stored in the refrigerator for future use. Expires one year after opening. Please record opening date on bottle.

INSTRUCTIONS FOR USE:
RCP-30-5A (EuroFlow™) are used with the EuroFlow™ standardization guidelines to study the initial PMT characterization, to set target MFI values, and to perform daily performance tracking of flow cytometers.

A. Preparation of Particles
1. Vortex the particles vigorously.
2. Dilute 3-5 drops to 1 mL of deionized water.

B. For the placement of PMT voltages for fluorescence measurements or for the determination of the EuroFlow™ SOP instrument settings visit:
T Kalina, et al. on behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708) (2012). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. ***Leukemia*, 26: 1986-2010.** Related link: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3437409/

C. For linearity assessment visit SPHERO™ Technical Note #8 Calibration and Performance Tracking of Flow Cytometer Using SPHERO™ Calibration Particles at https://www.spherotech.com/tech_SpheroTech_Note_8.html

D. For the determination of the flow cytometer sensitivity visit SPHERO™ Technical Note #17 Determination of a Flow Cytometer's Sensitivity Using Detection Efficiency (Q) and the Background Light Level (B) at https://www.spherotech.com/tech_SpheroTech_Note_17.html.

Molecules of Equivalent Fluorochrome (MEF) for RCP-30-5A (EuroFlow™)

Peak #	MEFL	MEPE	MEPTR	MECY	MEAP
1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	789	443	187	1,137	736
3	1,896	1,245	543	3,041	1,892
4	4,872	3,415	1,536	7,960	4,804
5	15,619	11,299	5,423	25,995	14,248
6	47,116	35,875	17,825	82,663	42,425
7	143,912	112,460	63,989	294,040	113,026
8	333,068	287,758	207,649	973,175	227,044

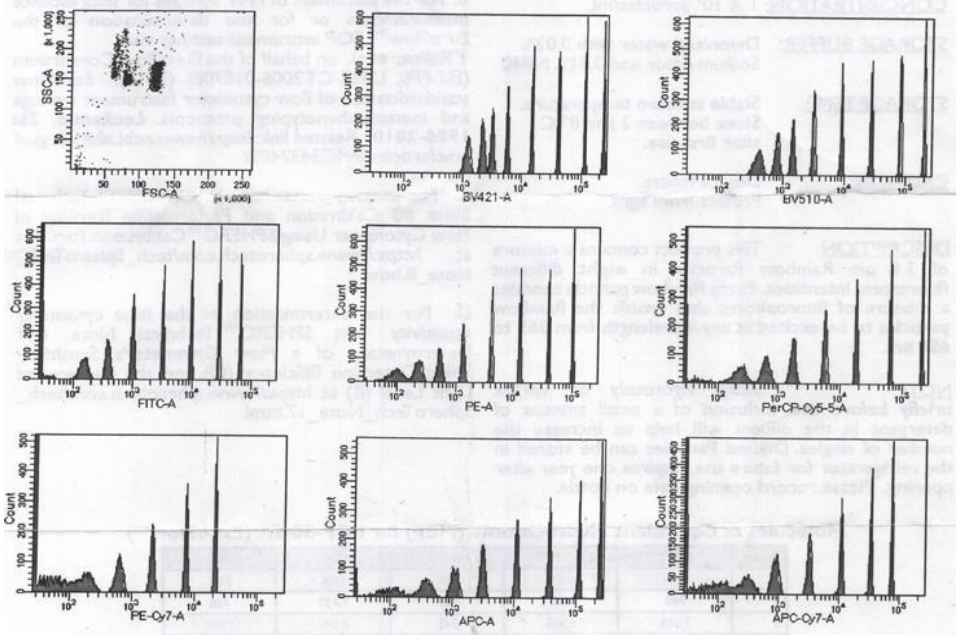
941-5349D

FOR RESEARCH APPLICATIONS ONLY. NOT FOR DIAGNOSTIC USE.

Dot Plot and Histograms for RCP-30-5A (EuroFlow™) on a BD Biosciences LSRFortessa™ X-20 using Assigned Target Values

FACSCanto™ Fluorescence Intensity Target Values for RCP-30-5A-7 (Peak 7)

Channel	Lower MFI (-15%)	Target Value	Upper MFI (+15)
Pacific Blue	90,855	106,888	122,922
Pacific Orange	72,500	85,294	98,088
FITC	23,292	27,402	31,513
PE	32,666	38,430	44,195
PerCP-Cy5.5	57,874	68,087	78,301
PE-Cy7	6,774	7,969	9,165
APC	95,180	111,976	128,773
APC-H7	28,594	33,641	38,687



SPHERO™ Rainbow Calibration Particles (EuroFlow™)
CATALOG NO.: RCP-30-5A EuroFlow™ LOT NO.: EAM01

941-5349D

ANEXO 7: PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA DE LISANTES

Se evaluarán 10 muestras de sangre de donantes voluntarios sanos teniendo en cuenta el siguiente procedimiento.

4. En un tubo se coloca 100ul de muestra
5. Se añaden 25 ul de Cóctel preparado en el laboaratorio con los siguientes reactivos: CD16 FITC, CD56 PE, CD4 Percp cy5.5, CD64 APC, CD19 PECY7, CD3 APCCY7, CD20 PB, CD45 PO todos de la marca (Exbio, Praga, República Checa), información disponible en: www.Exbio.com
6. Incubar media hora a temperatura ambiente y oscuridad,
7. Se agrega el volumen de solución de lisis de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, luego de finalizado el proceso de lisis, continuar los lavados de acuerdo con las recomendaciones del inserto. (Anexo 9, Anexo 10, Anexo 11). En el caso del lisante patrón continuar con las recomendaciones del SOP Euroflow, disponible en: www.Euroflow.org
8. Resuspender con un volumen de 500ul de PBS, solo para el caso de Optylise C resuspender con PBS formaldehido 0.1% de acuerdo con recomendaciones del fabricante.

ANEXO 8: PROCEDIMIENTO DE AJUSTE DE VOLTAJES

1. Ejecutar los protocolos de lavados y retiro de burbujas en ambos equipos.

2. Realizar el control de calidad diario de ambos equipos descritos en sus manuales respectivos, asegurándose de cumplir los requisitos.

3. Efectuar el ajuste de FSC/SSC con sangre lisada con Facs Lysing en el caso del instrumento patrón según media de linfocitos FSC: 52 000 SSC: 13 000 (descrito en SOP Euroflow) y el lisante elegido en el caso de Novocyte Advanteon. Tener en cuenta las diferentes escalas del instrumento para realizar la conversión. (18 bits en el instrumento patrón y Novocyte Advanteon 24 bits).

4. Adquirir las perlas Rainbow Beads y realizar el ajuste de voltajes del instrumento patrón de acuerdo con lo descrito en SOP Configuración del instrumento y

compensación, disponible en www.Euroflow.org. Tomando en cuenta los valores objetivo “target” recomendados por lote.

5. Procesar los tubos de compensación bajo los procedimientos descritos en los SOPs Euroflow y dividir la mitad para cada citómetro

6. Una vez ajustados los voltajes del citómetro patrón adquirir y registrar las medianas de las poblaciones positivas antes de calcular la compensación, realizar la conversión para la escala de citómetro Novocyte Advanteon.

7. Usando los valores obtenidos en el paso anterior realizar el ajuste de voltajes en Novocyte Advanteon.

8. Adquirir las perlas Rainbow Beads 8 picos (Spherotec, Lake Forest, IL) usando los voltajes obtenidos en el paso anterior.

ANEXO 9: INSERTO DE EXCELLISE EASY

EXCELLYSE Easy

Cat.No. ED7066

1. Intended purpose

Intended use

The EXCELLYSE Easy lysing solution is intended for red blood cell lysis following antibody staining of human peripheral blood leukocytes.

The lysing solution is appropriate for use with EXBIO single colour monoclonal antibodies and KOMBITEST reagents and may be used in both lyse/wash and lyse/no wash protocol.

Context of a physiological or pathological state

Leukocyte analysis and detection in peripheral blood requires elimination of interfering cells, mainly erythrocytes. Ficoll density gradient method is usually used to separate leukocytes from whole blood. This method is rather time consuming and may lead to a loss of certain leukocyte subsets. Direct blood sample staining followed by red blood cell lysis therefore takes place in clinical laboratories as a fast and accurate method for whole blood flow cytometry analysis.

2. Test principle

The peripheral whole blood specimen is stained with reagent containing specific monoclonal antibodies labeled with fluorochrome dyes. The antibodies in the reagent bind specifically to leukocyte surface antigens. The stained specimen is then treated with the EXCELLYSE Easy lysing solution, which lyses red blood cells under hypotonic conditions and preserves the monoclonal antibody stained leukocytes for further flow cytometry analysis.

3. Reagents provided

The content of the vial (100 ml) is sufficient for 1000-2000 tests, respectively. The lysing solution is a 10× concentrated and **must be diluted 10× with deionized water prior to use (1 volume of concentrated solution with 9 volumes of deionized water)**.

4. Materials required but not provided

Material necessary for collection of peripheral blood
Suitable 5ml test tubes for blood staining (e.g. 12 × 75 mm)
Phosphate buffered saline (PBS)
Deionized water
Appropriate fluorescent-dye-labeled primary/secondary antibody

5. Equipment required

Automatic pipettes with disposable tips
Vortex mixer
Centrifuge
Flow cytometer

6. Storage and handling

10× concentrated EXCELLYSE Easy store at 2-25 °C. The prepared solution (1× concentrated) is stable for 1 month when stored at room temperature.

7. Warnings, precautions and limitations of use

- Intended for In Vitro Diagnostic use in laboratories outside USA and Canada. This CE-IVD kit is in conformity with the European Directive 98/79/EC.
- Do not use the reagent after its expiration date.
- Do not use if any discoloration or precipitation occurs.
- Do not freeze.
- Avoid reagents contamination.
- Any non-performance of lysing protocol may produce false results.
- Blood samples are considered as potentially infectious and must be handled with care. Avoid all contact of the sample with the skin, eyes and mucosa.
- The reagent contains formaldehyde, methanol and diethylenglycol.

H-phrases
H302: Harmful if swallowed.
H315: Causes skin irritation.
H317: May cause an allergic skin reaction.
H319: Causes serious eye irritation.
H335: May cause respiratory irritation.
H341: Suspected of causing genetic defects.
H350: May cause cancer.
H373: May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure.

P-phrases
P202: Do not handle until all safety precautions have been read and understood
P270: Do not eat, drink or smoke when using this product.
P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P301 + P312: IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.
P302 + P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P332+P313: If skin irritation occurs: Get medical advice/ attention
P304+P340: IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing
P305 + P351 + P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P501: Dispose of contents/container to authorized facility for dangerous wastes.

- Red blood cells from abnormal patients may be resistant to lysis using lysing solutions.
- Flow cytometer may produce false results if the device has not been aligned and maintained appropriately.
- Data may be incorrectly interpreted if fluorescent signals were compensated wrongly or if gates were positioned inaccurately.
- Blood samples from abnormal patients may exhibit abnormal values of positive cells.

8. Specimen

The specimen shall be a human, peripheral whole blood. Blood must be collected into a tube containing an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA). Collected blood sample has to be retained in collection tube prior to staining and lysing. Refer to the antibody reagent IFU for storage restrictions after collection.

9. Procedure

Lyse/no wash lysing protocol

1. Collect peripheral blood in a sterile tube with an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA).
2. Follow instructions for whole blood antibody staining.
3. **Add 450 µl of diluted** lysing solution **per 50 µl** of whole blood. Mix the tube with a vortex mixer.
4. Incubate for about 5-10 minutes, until the blurry blood sample solution becomes clear.
5. Analyze the sample immediately using flow cytometer or store the sample at 2-8°C in the dark and analyze within 24 hours. No further cell fixation is required. See figures 1 and 2 for example data.

Fig. 1: Peripheral blood leukocytes dot-plot from lysed/non-washed whole blood.

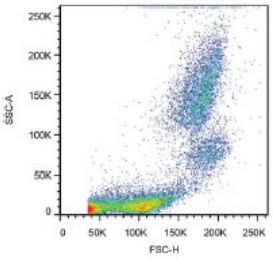
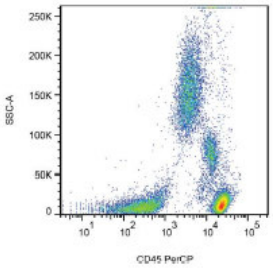


Fig. 2: Identification of CD45+ lymphocyte population in lysed/non-washed whole blood stained with anti-CD45 antibody.



Lyse/wash lysing protocol

1. Collect peripheral blood in a sterile tube with an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA).
2. Follow manufacturer's instructions for whole blood antibody staining.
3. **Add 1000 µl of diluted** lysing solution **per 50 µl** of whole blood. Mix the tube with a vortex mixer.
4. Incubate for about 5-10 minutes, until the blurry blood sample solution becomes clear.
5. Centrifuge the tube for 5 minutes at 300 g.
6. Remove supernatant and resuspend the pellet with 0.2 – 0.5 ml of PBS.
7. Analyze the sample immediately using flow cytometer or store the sample at 2-8 °C in the dark and analyze within 24 hours. No further cell fixation is required. See figures 3 and 4 for example data.

Fig. 3: Peripheral blood leukocytes dot-plot from lysed/washed whole blood.

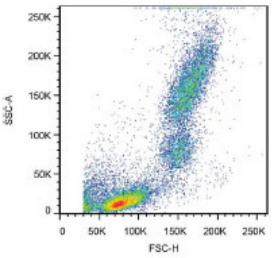
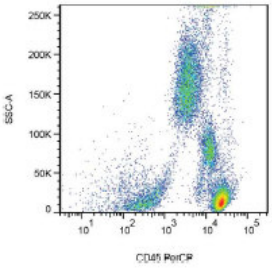


Fig. 4: Identification of CD45+ lymphocyte population in lysed/washed whole blood stained with anti-CD45 antibody.



10. Analytical performance

Repeatability and reproducibility

Test of sample **repeatability**, for reagent KOMBITEST CD3 FITC/CD16+CD56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC, was performed at one clinical site. Measurements were made on single blood sample in 12 test tubes in parallel. Coefficients of variation (CV) are given in the table bellow.

Lymphocyte Subset	n	Average	SD	CV
% CD3+	12	47.4	0.98	2.06
% CD16+CD56+	12	32.9	0.58	1.75
% CD19+	12	17.3	0.64	3.68

Test of sample **reproducibility**, for reagent KOMBITEST CD3 FITC/CD16+CD56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC, was performed at one clinical site. Measurements were made on stabilized blood sample (Immuno-Trol™ Cells, Beckman-Coulter) under the same conditions within time frame of 21 days. Coefficients of variation (CV) are given in the table bellow.

Lymphocyte Subset	n	Average	SD	CV
% CD3+	42	72.7	0.96	1.32
% CD16+CD56+	42	11.1	0.86	7.78
% CD19+	42	14.9	0.82	5.48

11. Clinical performance

n/a

12. References

n/a

13. Manufacturer

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 50 Vestec
Czech Republic

info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

14. Trademarks

n/a

15. Revision History

- Version 1, ED7066_IFU_v1
Initial Release
- Version 2, ED7066_IFU_v2
GHS symbols, H- and P- phrases introduced.
- Version 3, ED7066_IFU_v3
Registered trademark issued to EXCELLYSE®. Manufacturer postal code changed from 25242 to 25250.
- Version 4, ED7066_IFU_v4
The smaller version of the product (30 ml vial) is no longer produced and thus mentioned in IFU. H- and P- phrases revised.
- Version 5, ED7066_IFU_v5
The company logo changed. IFU layout changed. Registered trademark removed from EXCELLYSE.
- Version 6, ED7066_IFU_v6
Product Use Limitation text was refined.

ANEXO 10: INSERTO EXCELLYSE I

EXCELLYSE I

Cat.No. ED7065

1. Intended purpose

Intended use

The EXCELLYSE I lysing solution is intended for red blood cell lysis following antibody staining of human peripheral blood leukocytes.
The lysing solution is appropriate for use with EXBIO single colour monoclonal antibodies and KOMBITEST reagents and may be used in both lyse/wash and lyse/no wash protocol.

Context of a physiological or pathological state

Leukocyte analysis and detection in peripheral blood requires elimination of interfering cells, mainly erythrocytes. Ficoll density gradient method is usually used to separate leukocytes from whole blood. This method is rather time consuming and may lead to a loss of certain leukocyte subsets. Direct blood sample staining followed by red blood cell lysis therefore takes place in clinical laboratories as a fast and accurate method for whole blood flow cytometry analysis.

2. Test principle

n/a

3. Reagents provided

The content of the vial (100 ml) is sufficient for 500 - 1000 tests. The lysing solution is ready to use.

4. Materials required but not provided

Material necessary for collection of peripheral blood
Suitable 5ml test tubes for blood staining (e.g. 12 × 75 mm)
Phosphate buffered saline (PBS)
Deionized water
Appropriate fluorescent-dye-labeled primary/secondary antibody

5. Equipment required

Automatic pipettes with disposable tips
Vortex mixer
Centrifuge
Flow cytometer

6. Storage and handling

Store the EXCELLYSE I at 2-25 °C.

7. Warnings, precautions and limitations of use

- Intended for In Vitro Diagnostic use in laboratories outside USA and Canada. This CE-IVD kit is in conformity with the European Directive 98/79/EC.
- Do not use the reagent after its expiration date.
- Do not use if any discoloration or precipitation occurs.
- Do not freeze.
- Avoid reagents contamination.
- Blood samples are considered as potentially infectious and must be handled with care. Avoid all contact of the sample with the skin, eyes and mucosa.
- The reagent contains formaldehyde and methanol.
  H-phrases
  H302+H312+H332: Harmful if swallowed, in contact with skin or if inhaled.
  H317: May cause an allergic skin reaction.
  H351: Suspected of causing cancer.
  P-phrases
  P270: Do not eat, drink or smoke when using this product.
  P280: Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection.
  P301+P312: IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.
  P302+P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
  P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
  P501: Dispose of contents/container to authorized facility for dangerous wastes.
- See product Safety Data Sheet for full information on the potential hazards and how to work safely with the product.
- The flow cytometer should be calibrated on a routine basis using fluorescent microbeads to ensure stable sensitivity of detectors.
- Any non-performance of lysing protocol may produce false results.

8. Specimen

Collect peripheral blood in a sterile tube with an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA).

9. Procedure

Lyse/no wash lysing protocol

1. Collect peripheral blood in a sterile tube with an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA).
2. Follow instructions for whole blood antibody staining.
3. Add **100 µl of lysing solution** per **50 µl of whole blood**. Mix the tube with a vortex mixer.
4. Incubate for about 2-5 minutes at room temperature.
5. Add **1 ml of deionized water** to the tube, mix well, and incubate for about 5-10 minutes, until the blurry blood sample solution becomes clear.
6. Analyze the sample immediately using flow cytometer or store the sample at 2-8°C in the dark and analyze within 24 hours. No further cell fixation is required. See figures 1 and 2 for example data.

Fig. 1: Peripheral blood leukocytes dot-plot from lysed/non-washed whole blood, analyzed on BD FACSCanto™ cytometer.

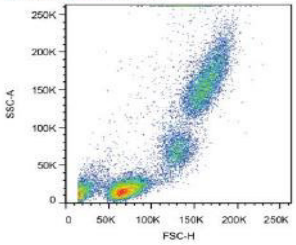
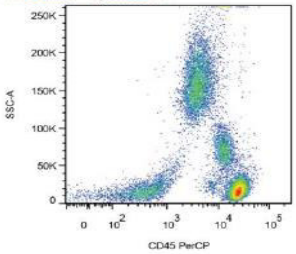


Fig. 2: Identification of CD45+ lymphocyte population in lysed/non-washed whole blood stained with anti-CD45 antibody, analyzed on BD FACSCanto™ cytometer.



Lyse/wash lysing protocol

1. Collect peripheral blood in a sterile tube with an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA).
2. Follow manufacturer's instructions for whole blood antibody staining.
3. Add **100 µl of lysing solution** per **50 µl of whole blood**. Mix the tube with a vortex mixer.
4. Incubate for about 2-5 minutes at room temperature.
5. Add 2-3 ml of deionized water to the tube, mix well, and incubate for about 5-10 minutes, until the blurry blood sample solution becomes clear.
6. Centrifuge the tube for 5 minutes at 300 g.
7. Remove supernatant and resuspend the pellet with 0.2 – 0.5 ml of PBS.
8. Analyze the sample immediately using flow cytometer or store the sample at 2-8 °C in the dark and analyze within 24 hours. No further cell fixation is required. See figures 3 and 4 for example data.

Fig. 3: Peripheral blood leukocytes dot-plot from lysed/washed whole blood, analyzed on BD FACSCanto™ cytometer.

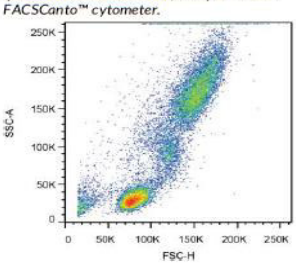
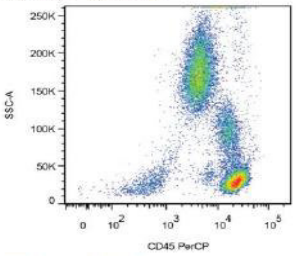


Fig. 4: Identification of CD45+ lymphocyte population in lysed/washed whole blood stained with anti-CD45 antibody, analyzed on BD FACSCanto™ cytometer.



10. Analytical performance

Precision (repeatability and reproducibility)

Repeatability was estimated by enumeration of leukocyte subsets in a single blood sample with KOMBITEST CD3 FITC/CD16+56 PE and KOMBITEST CD3 FITC/ CD19 PE (both EXBIO Praha). Measurements were repeated 10 times during one day using the same blood sample.

Lymphocyte Subset	n	Mean	SD	CV(%)
% $CD3^+$	10	47.4	0.98	2.1
% $CD16^+CD56^+$	10	32.9	0.58	1.8
% $CD19^+$	10	17.3	0.64	3.7

Reproducibility was estimated by enumeration of leukocyte subsets in Immuno-Troll™ Cells (Beckamnn Coulter) with KOMBITEST CD3 FITC/CD16+56 PE and KOMBITEST CD3 FITC/ CD19 PE (both EXBIO Praha). Measurements were performed 14 times during one month using the same LOT of Immuno-Troll™ cells.

Lymphocyte Subset	n	Mean	SD	CV(%)
% $CD3^+$	14	72.8	1.94	2.7
% $CD16^+CD56^+$	14	11.7	0.87	7.4
% $CD19^+$	14	13.2	1.16	8.8

11. Clinical performance

n/a

Interfering substances and limitations

Red blood cells from abnormal patients may be resistant to lysis using lysing solutions.
Flow cytometer may produce false results if the device has not been aligned and maintained appropriately.
Data may be incorrectly interpreted if fluorescent signals were compensated wrongly or if gates were positioned inaccurately.
Blood samples from abnormal patients may exhibit abnormal values of positive cells.

12. References

n/a

13. Manufacturer

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Czech Republic

info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

14. Trademarks

n/a

15. Revision History

- Version 1, ED7065_IFU_v1
Initial Release
- Version 2, ED7065_IFU_v2
GHS symbols, H- and P- phrases introduced.
- Version 3, ED7065_IFU_v3
Registered trademark issued to EXCELLYSE®. Manufacturer postal code changed from 25242 to 25250.
- Version 4, ED7065_IFU_v4
The smaller version of the product (30 ml vial) is no longer mentioned.
- Version 5, ED7065_IFU_v5
The company logo changed. IFU layout changed. Analytical performance data added. Registered trademark removed from EXCELLYSE.
- Version 6, ED7065_IFU_v6
Product Use Limitation text was refined.

ANEXO 11: INSERTO OPTYLISE C

OptiLyse® C
Lysis Solution

REF A11895
200 tests; 100 mL
0.5 mL / test

BECKMAN COULTER.

IVD CE

ENGLISH	Specifications Ready for use OptiLyse C Lysis Solution
Formulation	Buffered liquid solution containing 1.5% formaldehyde
Volume	100 mL
Number of vials	1 vial
Volume per test	0.5 mL

USE
This reagent is intended for the lysis of red blood cells in the preparation of biological samples for flow cytometry analysis after staining of leucocytes with fluorescent antibodies. Use of OptiLyse C is limited to samples for analysis using Beckman Coulter flow cytometers and is compatible with so-called « no wash» staining and lysis procedures so long as duly calibrated fluorescent antibodies are used for this purpose.

PRINCIPLE
The biological sample containing red blood cells for lysis is incubated in the presence of the OptiLyse C solution, which results in the lysis of red blood cells accompanied by the fixation of leucocytes.
A specific staining of leucocytes is first achieved by incubating the sample with the antibody or antibodies selected. The red cells are then removed by lysis and the leucocytes, which are fixed during this stage, are analyzed by flow cytometry.
Preparations must be stored between 2 and 8°C and rapidly analyzed by flow cytometry without prior washing being necessary.
The flow cytometer analyzes light diffusion and the fluorescence of cells. It makes possible the delimitation of the population of interest within the electronic window defined on a histogram, which correlates the orthogonal diffusion of light (Side Scatter or SS) and the diffusion of narrow-angle light (Forward Scatter or FS). Other histograms combining two of the different parameters available on the cytometer can be used as supports in the gating stage depending on the application chosen by the user.
The fluorescence of the delimited cells is analyzed in order to distinguish the positively-stained events from the unstained ones. The results are expressed as a percentage of positive events in relation to all the events acquired by the gating.

STORAGE AND STABILITY
OptiLyse C is stored between 18 and 25°C.
Vial closed, the reagent is stable up to the expiry date shown on vial.
After opening, the reagent is stable for 90 days.

PRECAUTIONS
1. Do not use the reagent beyond expiry date.
2. Do not store in the refrigerator, do not freeze.
3. Minimize exposure to light during incubation with fluorescent antibodies.
4. Avoid microbial contamination of the reagents, or false results may occur.
5. Formaldehyde is toxic and allergenic. It is thought to be a carcinogenic agent. Never pipette by mouth and avoid all contact with the skin, mucosae, eyes and clothing
6. All blood samples must be considered as potentially infectious and must be handled with care (in particular: the wearing of protective gloves, gowns and goggles).
7. Blood tubes and disposable material used for handling should be disposed of in ad hoc containers intended for incineration.

SAMPLES
Venous blood or bone marrow samples must be taken using sterile tubes containing an EDTA salt as the anticoagulant or ACD or heparin.
The samples should be kept at room temperature (18 – 25°C) and not shaken. The sample should be homogenized by gentle agitation prior to taking the test sample.
The samples must be analyzed within 24 hours of venipuncture.

METHODOLOGY
NECESSARY MATERIAL NOT SUPPLIED
- Sampling tubes and material required for sampling. Automatic pipettes with disposable tips for sampling of 20, 100, 500 and 1000 µL volumes.
- Plastic haemolysis tubes.
- Calibration beads: Flow-Set™ Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Specific fluorescent antibodies.
- Isotypic controls.
- Buffer (PBS: 0.01 M sodium phosphate; 0.145 M sodium chloride; pH 7.2).
- Fixation reagent. For example: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Centrifuge.
- Automatic agitator (Vortex type).
- Flow cytometer.

PREPARATION OF SAMPLES
The leucocyte content in the sample must be less than 10^4 cells / µL (10^{10} cells / L). If necessary, dilute in PBS to bring the leucocyte concentration to 5×10^3 cells / µL (5×10^9 cells / L).
The red cell concentration in the sample must be less than 6×10^6 cells / µL (6×10^{12} cells / L). If necessary, it is recommended that the sample be diluted in PBS to bring the red cell concentration down to 5×10^6 cells / µL.
If the leucocytic and erythrocytic concentrations need adjusting, the highest dilution must be carried out. The conjugated antibody staining procedures use 100 µL of sample (prediluted or otherwise) per tube.

PROCEDURE
Preparation of the reagent
No preparation is necessary. Use OptiLyse C directly from the vial.

Procedure
For each sample analyzed, in addition to the test tube, one control tube is required in which the cells are mixed with the isotypic control corresponding to the specific stain selected.

NB: The so-called « no wash » staining and lysis procedure described in stages 1 to 9 below is useful when duly calibrated fluorescent antibodies are used for this purpose.

1. Into each test tube, add the amount of antibody recommended by the manufacturer to stain 5×10^5 leucocytes.
2. Into each control tube, add the amount of isotypic control recommended by the manufacturer to stain 5×10^5 leucocytes.
3. Add 100 µL of the test sample (prediluted or otherwise) to both tubes. Vortex the tubes gently.
4. Incubate under the conditions set out in the data sheet of the antibodies used.
5. Add 0.5 mL of OptiLyse C and vortex immediately for 1 second.
6. Incubate for 10 minutes at room temperature (18 – 25°C) protected from light.
7. Add 0.5 mL of PBS and vortex.
8. Leave to incubate for at least 5 minutes at room temperature and away from light.
9. Analyze samples in the flow cytometer.

NB: If the preparations need to be washed, do not analyze before performing steps 10 and 11.

10. Centrifuge for 5 minutes at 300 x g at room temperature.
11. Remove the supernatant by aspiration and resuspend the cell pellet in 0.5 or 1 mL of PBS made up with 0.1 % formaldehyde.
    A 0.1 % formaldehyde PBS solution can be prepared by diluting 12.5 µL of the IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) at its ten-fold concentration in 1 mL of PBS.

NB: In all cases, keep the preparations between 2 and 8°C and away from light until the flow cytometric analysis, which should take place within 24 hours.

ANEXO 12: PORCENTAJE DE RECONOCIMIENTO AUTOMÁTICO POR LA BASE DE DATOS

	Advanteon	Facs Canto II
1	92.1	93.7
2	98.07	98.7
3	98.2	98.6
4	96.21	95.7
5	91.3	87.3
6	97.2	99.59
7	97.48	97.97
8	96.4	99.35
9	99.64	99.43
10	98.3	99.55
11	98.6	99.73
12	97.9	99.62
13	99.01	98.61
14	98.32	98.78
15	98.8	98.97
16	98	97.98
17	95.9	97.48
18	99	99.36
19	99.06	99.54
20	95.1	98.5

TABLA I: Porcentaje de reconocimiento automático por la base de datos entre ambos instrumentos.