



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Disposición

Número:

Referencia: EX-2021-64230010-APN-DGA#ANMAT

VISTO el N° EX-2021-64230010-APN-DGA#ANMAT del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma **BECTON DICKINSON ARGENTINA S.R.L.** solicita autorización para la venta de los Productos médicos para diagnóstico *in vitro* denominados: **662965 BD Multitest IMK KIT, 340499 BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 y 340500 BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19.**

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia y corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM de los productos médicos para diagnóstico *in vitro* objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Decreto N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) de los productos médicos para diagnóstico *in vitro*: **662965 BD Multitest IMK KIT, 340499 BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 y 340500 BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19** de acuerdo con lo solicitado por BECTON DICKINSON ARGENTINA S.R.L., con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulos y de instrucciones de uso que obran en documento N°IF-2022-51836845-APN-DFVGRM#ANMAT.

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM 634-600”, con exclusión de toda otra leyenda no autorizada y/o contemplada en la normativa vigente.

ARTÍCULO 4º.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese. Inscribáse en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica a los nuevos productos. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

NOMBRE COMERCIAL: 1) 662965 BD Multitest IMK KIT, 2) 340499 BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 y 3) 340500 BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19.

INDICACIÓN DE USO: 1) BD Multitest™ IMK kit con BD Trucount™ Tubes opcionales está previsto para su uso con los citómetros de flujo BD FACSLyric™, BD FACSCanto™ II, BD FACSCanto™ y BD FACSCalibur™ para determinar los porcentajes y los recuentos absolutos para la inmunofenotipificación de las siguientes subpoblaciones de linfocitos humanos maduros en sangre completa periférica: • Linfocitos T (CD3+) • Linfocitos B (CD19+) • Linfocitos citolíticos naturales (NK) (CD3–CD16+ o CD56+) • Linfocitos T colaboradores/inductores (CD3+CD4+) • Linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3+CD8+) **2) BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4:** El reactivo BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 con los tubos optativos BD Trucount™ está diseñado para uso con los citómetros de flujo BD FACSLyric™, BD FACSCanto™ II, BD FACSCanto™ y BD FACSCalibur™ para obtener recuentos absolutos de las siguientes poblaciones de linfocitos humanos maduros en sangre entera periférica para inmunofenotipificación: Linfocitos T (CD3+), Linfocitos T colaboradores (CD3+CD4+) y Linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3+CD8+). **3) BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19:** BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 con los tubos BD Trucount™ opcionales está diseñado para uso con los citómetros de flujo BD FACSLyric™, BD FACSCanto™ II, BD FACSCanto™ y BD FACSCalibur™ para obtener recuentos absolutos de las siguientes poblaciones de linfocitos humanos maduros en sangre periférica para inmunofenotipificación: Linfocitos T (CD3+), Linfocitos natural killer (NK) (CD3–CD16+ y/o CD56+) y Linfocitos B (CD3–CD19+). Todos estos reactivos están indicados para su uso en la evaluación inmunológica de individuos normales y pacientes con inmunodeficiencia o sospecha de

ella.

FORMA DE PRESENTACIÓN: **1) BD Multitest™ IMK kit contiene:** Reactivo BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 (1ml), BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 (1 ml) y BD Multitest IMK Lysing Solution (10 ml), suficiente para 50 determinaciones Individualmente cada componente tiene las siguientes presentaciones: **2) BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4:** Contiene 1 ml de reactivo BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 suficiente para 50 ensayos. **3) BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19:** Contiene 1 ml de reactivo BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 suficiente para 50 ensayos.

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 1) BD Multitest™ IMK kit: Vida útil: 19 meses. Almacenamiento: Almacenar en un lugar fresco y seco entre 2° y 25 °C protegido de la luz directa. 2) BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4: Vida útil: 19 meses. Almacenamiento: Almacenar en un lugar fresco y seco entre 2° y 25 °C protegido de la luz directa. 3) BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19: Vida útil: 24 meses. Almacenamiento: Almacenar en un lugar fresco y seco entre 2° y 25 °C protegido de la luz directa.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: Para BD Multitest™ IMK kit: 1) Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences 2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131. Para BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 y BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19: 1) Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences 2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131. 2) Becton Dickinson Caribe, LTD Vicks Drive, Lot 1 Corner Road 735 Cayey, PR Estados Unidos 00736.

CONDICIÓN DE USO/CATEGORÍA: Venta exclusiva a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.

Nº EX-2021-64230010-APN-DGA#ANMAT

AM



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: EX-2021-64230010-APN-DGA#ANMAT

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN

PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

Nº EX-2021-64230010-APN-DGA#ANMAT

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que, de acuerdo con lo solicitado por la firma **BECTON DICKINSON ARGENTINA S.R.L.** , se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de los nuevos productos médicos para diagnóstico in vitro con los siguientes datos identificatorios característicos:

NOMBRE COMERCIAL:1) 662965 BD Multitest IMK KIT, 2) 340499 BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 y 3) 340500 BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19.

INDICACIÓN DE USO: 1) **BD Multitest™ IMK kit** con BD Trucount™ Tubes opcionales está previsto para su uso con los citómetros de flujo BD FACSLyric™, BD FACSCanto™ II, BD FACSCanto™ y BD FACSCalibur™ para determinar los porcentajes y los recuentos absolutos para la inmunofenotipificación de las siguientes subpoblaciones de linfocitos humanos maduros en sangre completa periférica: • Linfocitos T (CD3+) • Linfocitos B (CD19+) • Linfocitos citolíticos naturales (NK) (CD3-CD16+ o CD56+) • Linfocitos T colaboradores/inductores (CD3+CD4+) • Linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3+CD8+) 2) **BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4:** El reactivo BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 con los tubos optativos BD Trucount™ está diseñado para uso con los citómetros de flujo BD FACSLyric™, BD FACSCanto™ II, BD FACSCanto™ y BD FACSCalibur™ para obtener recuentos absolutos de las siguientes poblaciones de linfocitos humanos maduros en sangre entera periférica para inmunofenotipificación: Linfocitos T (CD3+), Linfocitos T colaboradores (CD3+CD4+) y Linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3+CD8+). 3) **BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19:** BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 con los tubos BD Trucount™ opcionales está diseñado para uso con los citómetros de flujo BD FACSLyric™, BD FACSCanto™ II, BD FACSCanto™ y BD FACSCalibur™ para obtener recuentos absolutos de las siguientes poblaciones de linfocitos

humanos maduros en sangre periférica para inmunofenotipificación: Linfocitos T (CD3+), Linfocitos natural killer (NK) (CD3–CD16+ y/o CD56+) y Linfocitos B (CD3–CD19+). Todos estos reactivos están indicados para su uso en la evaluación inmunológica de individuos normales y pacientes con inmunodeficiencia o sospecha de ella.

FORMA DE PRESENTACIÓN: 1) **BD Multitest™ IMK kit contiene:** Reactivo BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 (1ml), BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 (1 ml) y BD Multitest IMK Lysing Solution (10 ml), suficiente para 50 determinaciones Individualmente cada componente tiene las siguientes presentaciones: 2) **BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4:** Contiene 1 ml de reactivo BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 suficiente para 50 ensayos. 3) **BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19:** Contiene 1 ml de reactivo BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 suficiente para 50 ensayos.

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 1) BD Multitest™ IMK kit: Vida útil: 19 meses. Almacenamiento: Almacenar en un lugar fresco y seco entre 2° y 25 °C protegido de la luz directa. 2) BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4: Vida útil: 19 meses. Almacenamiento: Almacenar en un lugar fresco y seco entre 2° y 25 °C protegido de la luz directa. 3) BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19: Vida útil: 24 meses. Almacenamiento: Almacenar en un lugar fresco y seco entre 2° y 25 °C protegido de la luz directa.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: Para BD Multitest™ IMK kit: 1) Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences 2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131. Para BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 y BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19: 1) Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences 2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131. 2) Becton Dickinson Caribe, LTD Vicks Drive, Lot 1 Corner Road 735 Cayey, PR Estados Unidos 00736.

CONDICIÓN DE VENTA/CATEGORÍA: Venta exclusiva a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del **PRODUCTO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PM 643-600.**

Nº EX-2021-64230010-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by Gestion Documental Electronica

Date: 2022.08.06 09:00:00 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica

Date: 2022.08.06 09:00:01 -03:00

PROYECTO DE RÓTULOS

Rótulos Externos

 **BD Multitest™ IMK Kit**

REF 662965†

For enumeration of human leucocyte subsets in whole blood. Contents: Conjugated murine monoclonal antibodies to cell-surface antigens and 10X buffered lysing solution.
†Reorder number for BD Multitest™ IMK Kit with BD Trucount™ Tubes is 662966.



Danger

Harmful if swallowed, in contact with skin or if inhaled.
Causes skin irritation.
Causes serious eye irritation.
May cause an allergic skin reaction.
Suspected of causing genetic defects.
May cause cancer.
May cause damage to organs.
May cause respiratory irritation.
May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure.
Harmful to aquatic life.

Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
Use only outdoors or in a well-ventilated area.
Wash thoroughly after handling.
Do not eat, drink or smoke when using this product.
Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.
Obtain special instructions before use.
Do not handle until all safety precautions have been read and understood.
Use personal protective equipment as required.
Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapors/spray.
Avoid release to the environment.
IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.
IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
IF ON SKIN: Wash with plenty of water/...
If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
IF SWALLOWED: Call a POISON CENTRE/doctor/... if you feel unwell.
Rinse mouth.
Call a POISON CENTER/doctor if you feel unwell.
Specific treatment (see on this label).
Wash contaminated clothing before reuse.
Store locked up.
Store in a well-ventilated place.
Keep container tightly closed.
Dispose of contents/container to an appropriate treatment and disposal facility in accordance with applicable laws and regulations, and product characteristics at time of disposal.

BD Multitest IMK Kit Lysing Solution contains 25 – <50% 2,2'-oxybisethanol (diethylene glycol), CAS 111-46-6; 5 – <10% formaldehyde, CAS 50-00-0; and 3 – <5% methanol, CAS 67-56-1.

 **BD Multitest™ IMK Kit**

REF 662965

BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4
BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19
BD Multitest™ IMK Lysing Solution



Individualmente, cada reactivo del kit tiene el siguiente rótulo externo:

1) **BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4:**

 **BD Multitest™** REF 340499
CD3/CD8/CD45/CD4

 **Rx Only** 
20 µL per test  2°C/8°C

 **BD Multitest™** REF 340499
CD3/CD8/CD45/CD4

LOT



© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of
Becton, Dickinson and Company.

Made in USA
23-20045-00

2) **BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19:**

 **BD Multitest™** REF 340500
CD3/CD16+CD56/CD45/CD19

 **Rx Only** 
20 µL per test  2°C/8°C

 **BD Multitest™** REF 340500
CD3/CD16+CD56/CD45/CD19

LOT



© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of
Becton, Dickinson and Company.

Made in USA
23-20046-00

Establecimiento importador:



Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina S.R.L.

BECTON DICKINSON ARGENTINA S.R.L.
Av. Del Libertador 110 2° Piso - C.P. B1638BEN
Vicente López – Buenos Aires - Argentina
Tel.: 0800 444 5523



Becton Dickinson Argentina SRL

Depósito: Av Otto Krausse N° 4.205/ Av. Ingeniero Eiffel N° 4.180, sector J/4250, El Triángulo, Partido de Malvinas Argentinas.

Teléfono: 0800-444-5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Establecimiento elaborador:

662965 BD Multitest™ IMK kit

-Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences
2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131

BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4

-Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences
2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131

-Becton Dickinson Caribe, LTD
Vicks Drive, Lot 1 Corner Road 735 Cayey, PR Estados Unidos 00736

BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19

-Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences
2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131

-Becton Dickinson Caribe, LTD
Vicks Drive, Lot 1 Corner Road 735, Cayey, PR Estados Unidos 00736

Director Técnico: Nora Silvina Lucero, Farmacéutica MN N° 15.549

USO PROFESIONAL EXCLUSIVO – VENTA EXCLUSIVA A LABORATORIOS DE ANALISIS CLINICOS.

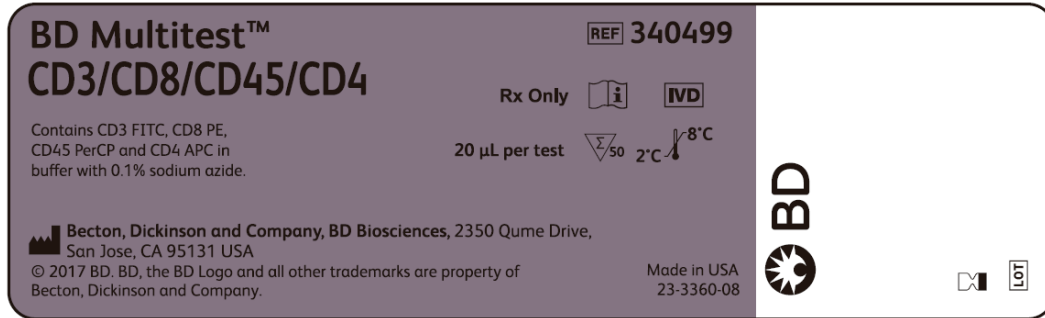
Autorizado por la ANMAT. PM-634-600


Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

PROYECTO DE RÓTULOS


Rótulos Primarios

1) Multitest CD3/CD8/CD45/CD4:





BD Multitest™
CD3/CD8/CD45/CD4

REF 340499




Rx Only  IVD

Contains CD3 FITC, CD8 PE, CD45 PerCP and CD4 APC in buffer with 0.1% sodium azide.

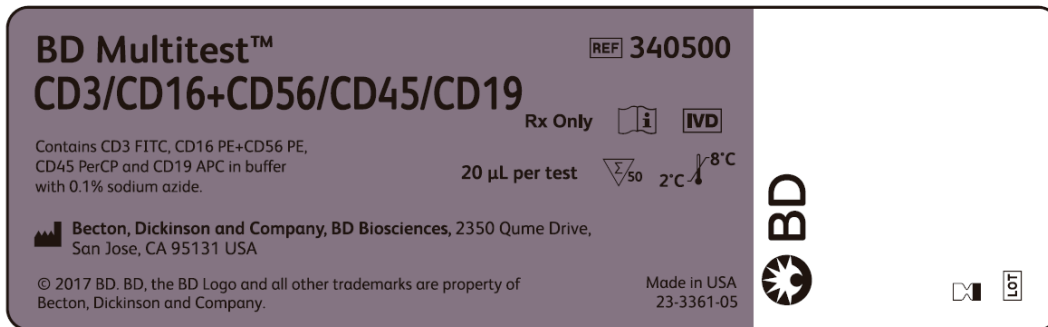
20 µL per test  50 2°C  8°C

Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131 USA
© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Made in USA
23-3360-08




2) BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19:





BD Multitest™
CD3/CD16+CD56/CD45/CD19

REF 340500




Rx Only  IVD

Contains CD3 FITC, CD16 PE+CD56 PE, CD45 PerCP and CD19 APC in buffer with 0.1% sodium azide.

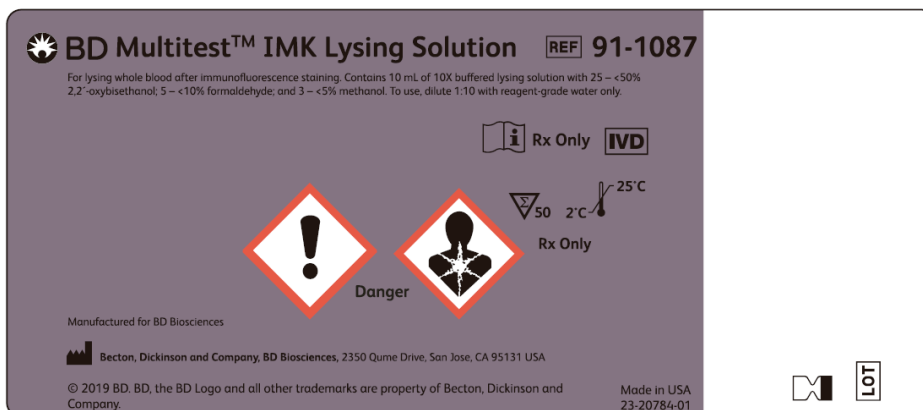
20 µL per test  50 2°C  8°C

Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131 USA
© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Made in USA
23-3361-05






3) BD Multitest™ IMK Lysing Solution





BD Multitest™ IMK Lysing Solution REF 91-1087

For lysing whole blood after immunofluorescence staining. Contains 10 mL of 10X buffered lysing solution with 25 – <50% 2,2'-oxybisethanol; 5 – <10% formaldehyde; and 3 – <5% methanol. To use, dilute 1:10 with reagent-grade water only.

 Rx Only IVD

  Danger



 50 2°C  25°C

Rx Only

Manufactured for BD Biosciences

Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131 USA
© 2019 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Made in USA
23-20784-01




Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

BECTON DICKINSON ARGENTINA S.R.L.
Av. Del Libertador 110 2° Piso - C.P. B1638BEN
Vicente López – Buenos Aires - Argentina
Tel.: 0800 444 5523



Establecimiento importador:

Becton Dickinson Argentina SRL

Depósito: Av Otto Krausse N° 4.205/ Av. Ingeniero Eiffel N° 4.180, sector J/4250, El Triángulo, Partido de Malvinas Argentinas.

Teléfono: 0800-444-5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Establecimiento elaborador:

662965 BD Multitest™ IMK kit

-Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences
2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131

BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4

-Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences
2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131

-Becton Dickinson Caribe, LTD
Vicks Drive, Lot 1 Corner Road 735 Cayey, PR Estados Unidos 00736

BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19

-Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences
2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131

-Becton Dickinson Caribe, LTD
Vicks Drive, Lot 1 Corner Road 735, Cayey, PR Estados Unidos 00736

BD Multitest™ IMK Lysing Solution

Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences
2350 QUME DR., San Jose, CA Estados Unidos 95131

Director Técnico: Nora Silvina Lucero, Farmacéutica MN N° 15.549

**USO PROFESIONAL EXCLUSIVO – VENTA EXCLUSIVA A
LABORATORIOS DE ANALISIS CLINICOS.**

Autorizado por la ANMAT. PM-634-600

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Karina Traverso', is positioned above a printed stamp. The stamp contains the following text: 'Karina Valeria Traverso', 'Co-Directora Técnica / Apoderada', 'M.N. 14.733 - M.P. 20.293', and 'Becton Dickinson Argentina SRL'.

Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

PROYECTO DE INSTRUCCIONES DE USO

INSTRUCCIONES DE USO

662965 BD Multitest™ IMK kit

BD Multitest™ IMK Kit
50 análisis, n.º de catálogo 662965
50 análisis con BD Trucount™ Tubes,
n.º de catálogo 662966

IVD **Rx Only**

© 2019 BD. El logotipo de BD y los demás signos
comerciales son propiedad de Becton, Dickinson and
Company.

23/07/19

Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Quince Drive
San Jose, CA 95131 USA

23-23960-01

clinicalapplications@bd.com
<http://www.bd.com/products/ivd>
bdsciences.com
ClinicalApplications@bd.com

Document: 23-23042-01 **D**
Valid From: 12-Oct-2020 To: 31-Dec-9999 **D**
Print Date: 23-Oct-2020 19:47:18 GMT Daylight Time **U**

340499 – BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4

340499

BD Multitest™
CD3/CD8/ CD45/CD4
50 ensayos por kit —Número de catálogo 340499
50 ensayos por kit con los tubos BD Trucount™ —Número de
catálogo 340493

DISPOSITIVOS **Solo con**
PARA **indicación**
DIAGNÓSTICO **profesional**
IN VITRO
(IVD)

© 2017 BD. La marca BD, el logotipo de BD y
todos los otros signos registrados pertenecen a
Becton, Dickinson and Company.

8/2017

23-3600-06

Becton, Dickinson and
Company
BD Biosciences
2350 Quince Drive
San Jose, CA 95131,
95131 EE.UU.

clinicalapplications@bd.com
<http://www.bd.com/products/ivd>

1

340500 – BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19

340500

BD Multitest™
CD3/CD16+CD56/CD45/CD19
50 ensayos por kit —Número de catálogo 340500
50 ensayos por kit con tubos BD Trucount™ —Número de catálogo
340503

DISPOSITIVOS **Solo con**
PARA **prescripción**
DIAGNÓSTICO **médica**
IN VITRO
(IVD)

© 2017 BD. La marca BD, el logotipo de BD y todos
los otros signos registrados pertenecen a Becton,
Dickinson and Company.

8/2017

23-3601-04

Becton, Dickinson and
Company
BD Biosciences
2350 Quince Drive
San Jose, CA 95131,
95131 EE.UU.

clinicalapplications@bd.com
<http://www.bd.com/products/ivd>

1


Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

BECTON DICKINSON ARGENTINA S.R.L.
Av. Del Libertador 110 2° Piso - C.P. B1638BEN
Vicente López – Buenos Aires - Argentina
Tel.: 0800 444 5523



Establecimiento importador:

Becton Dickinson Argentina SRL

Depósito: Av Otto Krausse N° 4.205/ Av. Ingeniero Eiffel N° 4.180, sector J/4250, El Triángulo, Partido de Malvinas Argentinas.

Teléfono: 0800-444-5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Establecimiento elaborador:

662965 BD Multitest™ IMK kit

-Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences
2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131

BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4

-Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences
2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131

-Becton Dickinson Caribe, LTD

Vicks Drive, Lot 1 Corner Road 735 Cayey, PR Estados Unidos 00736

BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19

-Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences
2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131

-Becton Dickinson Caribe, LTD

Vicks Drive, Lot 1 Corner Road 735, Cayey, PR Estados Unidos 00736

Director Técnico: Nora Silvina Lucero, Farmacéutica MN N° 15.549

USO PROFESIONAL EXCLUSIVO – VENTA EXCLUSIVA A LABORATORIOS DE ANALISIS CLINICOS.

Autorizado por la ANMAT. PM-634-600


Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

BD Multitest™ IMK Kit

50 análisis, n.º de catálogo 662965

**50 análisis con BDTrucount™ Tubes,
n.º de catálogo 662966**


Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - H.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

23-23042-02
1/2021

Rx Only

IVD


Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

CONTENIDO

1. USO PREVISTO.....	5
2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN	5
3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO	6
4. REACTIVOS	7
Composición del reactivo	7
Reactividad cruzada	9
Precauciones	10
Conservación y manipulación.....	12
5. INSTRUMENTOS	13
6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	15
Condiciones que causan interferencias.....	16
7. REACTIVOS Y MATERIALES	16
Reactivos suministrados	16
Reactivos y materiales necesarios que no se suministran.....	16
8. INSTRUCCIONES DE USO	18
Dilución de BD Multitest™ IMK Kit Lysing Solution.....	18
Realización del pipeteado inverso	18
Realización del control de calidad	18
Tinción de las células.....	19
Adquisición de muestras.....	21

9. RESULTADOS.....	21
Cálculo de recuentos absolutos.....	21
Datos representativos	22
10. LIMITACIONES.....	28
11. VALORES ESPERADOS	29
12. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO.....	30
Citómetro de flujo BD FACSLyric™.....	30
Citómetro de flujo BD FACSCanto™ II.....	46
Citómetro de flujo BD FACSCanto™.....	50
Citómetro de flujo BD FACSCalibur™.....	54
13. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....	58
GARANTÍA.....	59
REFERENCIAS	59
MARCAS COMERCIALES	64
INFORMACIÓN DE CONTACTO	65

1. USO PREVISTO

BD Multitest™ IMK Kit con BD Trucount™ Tubes opcionales está previsto para su uso con los citómetros de flujo BD FACSLyric™, BD FACSCanto™ II, BD FACSCanto™ y BD FACSCalibur™ para determinar los porcentajes y los recuentos absolutos de las siguientes subpoblaciones de linfocitos humanos maduros en sangre completa periférica para la inmunofenotipificación:

- Linfocitos T (CD3⁺)
- Linfocitos B (CD19⁺)
- Linfocitos citolíticos naturales (NK) (CD3⁻CD16⁺ o CD56⁺)
- Linfocitos T colaboradores/inductores (CD3⁺CD4⁺)
- Linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3⁺CD8⁺)

Este reactivo está indicado para su uso en la evaluación inmunológica de individuos normales y pacientes con inmunodeficiencia o sospecha de ella.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los linfocitos humanos pueden dividirse en tres poblaciones principales según su función biológica y la expresión del antígeno de superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos citolíticos naturales.

Los porcentajes o recuentos absolutos de linfocitos T, linfocitos B, linfocitos T colaboradores/inductores y linfocitos T supresores/citotóxicos sirven para caracterizar y controlar algunas formas de enfermedades de inmunodeficiencia¹⁻³ y autoinmunitarias.^{4,5}

Los linfocitos colaboradores/inductores son una subpoblación de linfocitos T (CD3⁺) que son CD4⁺. La determinación de los porcentajes o recuentos de linfocitos T colaboradores/inductores puede ser de utilidad para controlar a personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).⁶ Las personas con VIH suelen presentar una disminución constante de los recuentos de linfocitos T colaboradores/inductores conforme avanza la enfermedad.⁷

Los Centers for Disease Control (CDC) recomiendan utilizar combinaciones de reactivos que contengan anticuerpos CD3 para determinar el porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos T en sujetos infectados con VIH.⁸ BD Multitest™ IMK Kit permite identificar y cuantificar los linfocitos T colaboradores/inductores por separado de los monocitos CD3⁻CD4⁺ contaminantes.⁹⁻¹¹

Los linfocitos supresores/citotóxicos son una subpoblación de linfocitos T (CD3⁺) que son CD8⁺. El porcentaje de linfocitos supresores/citotóxicos queda fuera del intervalo de referencia normal en algunas enfermedades autoinmunitarias.¹² El porcentaje relativo de la subpoblación de CD8⁺ es elevado en un gran número de pacientes con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, como la inmunodeficiencia combinada grave (IDCG)¹ o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).⁶

Los linfocitos NK identificados como CD3⁻ y CD16⁺ y/o CD56⁺ han demostrado que actúan como mediadores de citotoxicidad contra determinados tumores y células infectadas con virus.¹³ La citotoxicidad mediada por linfocitos NK no requiere que haya moléculas de complejo de histocompatibilidad principal (CHP) de clase I o clase II presentes en la célula diana.¹⁴

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se añade sangre completa al reactivo, los anticuerpos marcados con fluorocromo presentes en él se unen específicamente a los antígenos de superficie de los leucocitos. Las muestras teñidas se tratan para lisar los eritrocitos. Durante la adquisición, las células pasan a través del haz del láser y dispersan la luz del láser. Las células teñidas emiten fluorescencia. Estas señales de dispersión y fluorescencia, detectadas por el instrumento, proporcionan información acerca del tamaño de la célula, su complejidad interna y la intensidad relativa de la fluorescencia.

Los reactivos BD Multitest™ utilizan activación de fluorescencia, lo que permite incluir directamente en un área de selección por fluorescencia la población de linfocitos⁹⁻¹¹ con el fin de reducir la contaminación de eritrocitos no lisados o nucleados en dicha área de selección.

Cuando se utilizan BD Trucount™ Tubes, se realiza la tinción de un volumen de muestra conocido directamente en un BD Trucount™ Tube. El sedimento liofilizado en el tubo se disuelve, lo que libera una cantidad conocida de microesferas fluorescentes. Durante el análisis, el recuento absoluto (células/µl) de células del área de selección en la muestra puede determinarse mediante la comparación entre eventos celulares y eventos de microesferas. Si se utiliza un software de BD específico para citómetro (consulte la Tabla 1, en la sección Instrumentos), este determina los recuentos absolutos. Si se realiza un análisis manual de los datos, simplemente habrá que dividir el número de eventos celulares positivos entre el número de eventos de microesferas y, luego, multiplicar por el número de microesferas BD Trucount™ por sedimento dividida por el volumen de la muestra en µl.

4. REACTIVOS

Composición del reactivo

El BD Multitest™ IMK Kit se suministra en forma de un vial de cada uno de los siguientes reactivos:

- BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 contiene CD3 marcado con FITC, clon SK7;¹⁵⁻¹⁷ CD8 marcado con PE, clon SK1;^{18,19} CD45 marcado con PerCP, clon 2D1 (HLe-1);²⁰ y CD4 marcado con APC, clon SK3.^{18,19,21}
- BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 contiene CD3 marcado con FITC, clon SK7; CD16 marcado con PE, clon B73.1,²²⁻²⁴ y CD56 marcado con PE, clon NCAM 16.2;²⁵ CD45 marcado con-PerCP, clon 2D1 (HLe-1) y CD19 marcado con APC, clon SJ25C1.²⁶

CD3 reacciona con la cadena épsilon del complejo de antígeno CD3/ receptor del antígeno de células T (TCR).²⁷ El antígeno CD3 está presente en el 61–85 % de los linfocitos de sangre periférica normal.²⁸

El antígeno CD4,^{19,29} de un peso molecular de 55 kilodaltons (kDa),³⁰ está presente en una subpoblación de linfocitos T^{31,32} (CD3⁺CD4⁺) que representa el 28–58 %²⁸ de los linfocitos de sangre periférica normales.^{19,30} El antígeno CD4 está presente en baja densidad en la superficie celular y en el citoplasma de los monocitos.

El antígeno CD8 se expresa en la subunidad α de 32-kDa de un complejo bimolecular con puentes disulfuro.^{33,34} El antígeno CD8 está presente en una subpoblación de linfocitos T,^{19,30-32,35,36} así como en una subpoblación de linfocitos NK.³⁷ El antígeno CD8 se expresa en el 19–48 % de los linfocitos de sangre periférica normales²⁸ y en el 60–85 % de los timocitos normales.^{19,30}

CD16 junto con CD56 facilitan la identificación de la población de linfocitos NK.^{10,13} CD16 reconoce un antígeno de linfocito NK humano de 50 a 70 kDa que es un receptor para el Fc de la IgG.^{22,23,38} El antígeno CD16 reacciona de forma variable con los granulocitos.²³ CD56 reconoce un dominio tipo inmunoglobulina extracelular común a tres formas de peso molecular distinto (120, 140 y 180 kDa) de la molécula de adhesión celular neural (NCAM).³⁹⁻⁴¹

CD19 reconoce un antígeno de 90-kDa que está presente en los linfocitos B humanos.^{26,42} El antígeno CD19 está presente en alrededor del 7–23 % de los linfocitos de sangre periférica humana²⁸ y en los esplenocitos.⁴³ El antígeno CD19 está presente en los linfocitos B humanos en todas las fases de maduración.⁴⁴ CD19 no reacciona con los linfocitos T, granulocitos o monocitos en reposo o activados.⁴⁵

CD45 reconoce los antígenos de leucocitos humanos, de 180 a 220 kDa, que forman parte de la familia T200.⁴⁶ El antígeno CD45 está presente en todos los leucocitos humanos en sangre periférica, incluidos los linfocitos, monocitos, granulocitos, eosinófilos y basófilos, y participa en la transducción de señales, modificando señales procedentes de otras moléculas de superficie.⁴⁶ Se ha observado que el anticuerpo frente a CD45 reacciona débilmente con eritrocitos y trombocitos maduros circulantes.^{46,47}

Los anticuerpos CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 y CD45 están compuestos por cadenas pesadas de IgG₁ y cadenas ligeras kappa de ratón.

El anticuerpo CD56 está compuesto por cadenas pesadas IgG_{2b} y cadenas ligeras kappa de ratón.

Las concentraciones de los anticuerpos conjugados se muestran en la tabla siguiente:



Reactivo	Concentración (µg/ml)
CD3 FITC	2,3
CD8 PE	1,75
CD16 PE + CD56 PE	2,75
CD45 PerCP	7,5
CD4 APC	0,92
CD19 APC	2,3

Reactividad cruzada

El anticuerpo CD8 reacciona con los linfocitos NK,³⁷ así como con los linfocitos T supresores/citotóxicos. El anticuerpo CD4 reacciona con los monocitos y con los linfocitos T colaboradores/inductores.²¹ El antígeno CD16 se expresa en los neutrófilos.¹⁴ El antígeno CD56 está presente aproximadamente en el 5 % de los linfocitos de sangre periférica CD3⁺.¹⁴

Precauciones

- No utilice los reactivos si observa cambios en su aspecto. La precipitación o el cambio de color indican inestabilidad o deterioro.
- Si se utiliza BD Trucount™ Tubes, es necesario calibrar las pipetas para que administren exactamente 50 µl de muestra. Se recomienda la realización de la técnica de pipeteado inverso de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la pipeta.
- El recuento de microesferas varía según el lote de BD Trucount™ Tubes. Es fundamental usar el recuento de microesferas que se indica en el lote actual de BD Trucount™ Tubes al introducir este valor en el software o al calcular manualmente los recuentos absolutos. Se recomienda no mezclar varios lotes de tubos en el mismo procesamiento.
- Los BD Trucount™ Tubes están diseñados para utilizarse con un procedimiento de lisado/no lavado específico. No establezca el umbral en dispersión frontal (FSC) para la recogida de datos.
- Los reactivos de anticuerpos contienen azida sódica como conservante; sin embargo, es preciso extremar las precauciones para evitar la contaminación microbiana, que podría causar resultados erróneos.
- BD Multitest™ IMK Kit Lysing Solution contiene dietilenglicol al 25 – <50 % 2,2'-oxibis-etanol (dietilenglicol), número CAS 111-46-6; formaldehído al 5 – <10 %, número CAS 50-00-0, y metanol al 3 – <5 %, número CAS 67-56-1. La solución de lisado se clasifica como peligrosa según el Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Visite regdocs.bd.com para descargar la ficha de datos de seguridad.

	Peligro
 	<p>H302 + H312 + H332: Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación.</p> <p>H315: Provoca irritación cutánea.</p> <p>H319: Provoca irritación ocular grave.</p> <p>H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.</p> <p>H341 Se sospecha que provoca defectos genéticos.</p> <p>H350: Puede provocar cáncer.</p> <p>H371: Puede provocar daños en los órganos.</p> <p>H335: Puede irritar las vías respiratorias.</p> <p>H373: Puede perjudicar a determinados órganos por exposición prolongada o repetida.</p> <p>H402: Nocivo para los organismos acuáticos.</p>
Prevención	<p>P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.</p> <p>P271: Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado.</p> <p>P264: Lavarse concienzudamente tras la manipulación.</p> <p>P270: No comer, beber ni fumar durante su utilización.</p> <p>P272: Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.</p> <p>P201: Pedir instrucciones especiales antes del uso.</p> <p>P202: No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.</p> <p>P281: Utilizar el equipo de protección individual obligatorio.</p> <p>P260: No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.</p> <p>P273: Evitar su liberación al medio ambiente.</p>

Respuesta	<p>P304+P340: EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración.</p> <p>P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.</p> <p>P337+P313: Si persiste la irritación ocular: consultar a un médico.</p> <p>P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.</p> <p>P333 + P313: En caso de irritación o erupción cutánea: consultar a un médico.</p> <p>P301 + P312: EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico si la persona se encuentra mal.</p> <p>P330: Enjuagarse la boca.</p> <p>P312: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico si la persona se encuentra mal.</p> <p>P321: Se necesita un tratamiento específico (ver la ficha de datos de seguridad).</p> <p>P363: Lavar las prendas contaminadas antes de volver a usarlas.</p>
Conservación	<p>P405: Guardar bajo llave.</p> <p>P403: Almacenar en un lugar bien ventilado.</p> <p>P233: Mantener el recipiente herméticamente cerrado.</p>
Eliminación	<p>P501: Eliminar el contenido o el recipiente en una planta de tratamiento y eliminación de residuos de conformidad con la normativa vigente y las características del producto en el momento de su eliminación.</p>

ADVERTENCIA Se consideran de riesgo biológico todas las muestras biológicas y todos los materiales que hayan entrado en contacto con ellas. Deben manipularse como si fueran potencialmente infecciosos^{48,49} y desecharse respetando las precauciones adecuadas de acuerdo con la normativa vigente. Nunca pipetee con la boca. Utilice ropa protectora, protección ocular y guantes adecuados. Se ha notificado que la fijación inactiva el VIH.⁵⁷

Conservación y manipulación

- Almacene el reactivo a una temperatura de 2–8 °C. No los utilice después de la fecha de caducidad que figura en la etiqueta.
- No congele el reactivo ni lo exponga a la luz directa durante su almacenamiento o la incubación con células. Mantenga seco el vial del reactivo.

- El reactivo es estable si se mantiene en el instrumento BD FACSDuet™ por 8 horas al día durante 5 días. No deje el reactivo en el instrumento durante la noche. El usuario debe validar el uso de cualquier reactivo restante que haya quedado en el instrumento BD FACSDuet™ durante 5 días.
- Almacene los BD Trucount™ Tubes en su bolsa de papel de aluminio original a una temperatura de 2–25 °C. Para evitar una posible condensación, no abra la bolsa de papel de aluminio hasta que haya alcanzado la temperatura ambiente y vuelva a cerrarla con cuidado inmediatamente después de extraer un tubo. Una bolsa que no se ha abierto es estable hasta la fecha de caducidad que se indica en el envase. No abra la bolsa ni use los tubos después de la fecha de caducidad. Use los tubos en el plazo de 1 hora después de extraerlos de la bolsa de papel de aluminio. Use el resto de los tubos en el plazo de 1 mes después de la apertura de la bolsa.

5. INSTRUMENTOS

BD Multitest™ IMK Kit y BD Trucount™ Tubes están diseñados para utilizarse en un citómetro de flujo que esté equipado con el hardware y el software informáticos adecuados. BD ha desarrollado un software específico para citómetro que puede ajustar los voltajes de los tubos fotomultiplicadores (PMT) y la compensación de fluorescencia, comprobar la sensibilidad y el rendimiento del citómetro y realizar controles de calidad diarios. BD también ha desarrollado un software que calcula automáticamente los recuentos absolutos cuando se utilizan BD Trucount™ Tubes. Sin embargo, es posible utilizar otros paquetes de software fabricados por empresas que no sean BD para la adquisición y el análisis de datos, así como calcular manualmente los recuentos absolutos. Se recomienda utilizar los sistemas BD enumerados en la Tabla 1 para la calibración del citómetro y la adquisición y el análisis de muestras. Consulte las instrucciones de uso del reactivo, el citómetro o el software correspondientes para obtener más detalles.

Se pueden obtener resultados con otras plataformas. El citómetro debe estar equipado con láseres de 635 nm y 488 nm con capacidad para detectar la dispersión de luz (frontal y lateral) y la fluorescencia tetracromática con emisión detectable en cuatro rangos:

- 515–545 nm
- 562–607 nm
- >650 nm
- 652–668 nm

El citómetro debe poder establecer un umbral o discriminar utilizando el canal de >650 nm. Los usuarios de citómetros de flujo fabricados por empresas distintas de BD deben consultar las instrucciones del fabricante para configurar la inmunofenotipificación tetracromática.

El BD FACSTTM Loader y el BD FACSTTM Universal Loader pueden utilizarse con este producto. Consulte las instrucciones de uso del citómetro utilizado con su Loader para obtener más información.

El sistema de preparación de muestras BD FACSDuetTM puede utilizarse con este producto. Consulte *BD FACSLyricTM Flow Cytometer with the Integrated BD FACSDuetTM Sample Preparation System Instructions for Use* (Instrucciones de uso del citómetro de flujo BD FACSLyricTM con sistema de preparación de muestras BD FACSDuetTM integrado) para obtener más información.

Asegúrese de que el instrumento está configurado correctamente y supera el control de calidad diario antes de su uso.

Tabla 1 Sistemas BD recomendados

Citómetro de flujo	Microesferas de calibración	Software de calibración	Software de análisis
BD FACSLytic™	BD® CS&T Beads BD® FC Beads 7-Color Kit	Software BD FACSuite™ Clinical versión 1.1 o posterior	Software BD FACSuite™ Clinical versión 1.1 o posterior
BD FACSCanto™ BD FACSCanto™ II	BD FACSTM 7-Color Setup Beads	BD FACSCanto™ Clinical Software	BD FACSCanto™ Clinical Software
BD FACSCalibur™	BD Calibrite™ 3-Color Kit y BD Calibrite™ APC Beads	Software BD FACSComp™ versión 4.0 o posterior	Software BD Multiset™

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Extraiga sangre asépticamente por venopunción utilizando BD Vacutainer® EDTA blood collection tubes.⁵⁰ Los reactivos de BD Multitest™ IMK Kit y los BD Trucount™ Tubes se han validado con formulaciones líquidas y secas de ácido tetraacético de etilendiamina (EDTA).

Para este procedimiento se necesitan como mínimo 200 µl de sangre completa. Siga las indicaciones del fabricante del tubo de extracción respecto al volumen mínimo de sangre que debe extraerse para garantizar la dilución correcta de la muestra, especialmente a la hora de determinar los recuentos absolutos con microesferas BD Trucount™.

Obtenga el recuento de leucocitos y la fórmula leucocitaria de la misma muestra de sangre completa antes de la tinción para garantizar que el recuento de leucocitos esté dentro del intervalo lineal del instrumento adecuado o para calcular los recuentos absolutos a partir de porcentajes.

La sangre con anticoagulante almacenada a temperatura ambiente (20–25 °C) debe teñirse en las 48 horas posteriores a la extracción y después analizarse en las 24 horas siguientes a la tinción.

Condiciones que causan interferencias

No use muestras de pacientes previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre completa refrigeradas antes de su tinción podrían dar resultados anómalos. Las muestras obtenidas de pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores pueden ofrecer una escasa diferenciación.⁵¹ Los blastocitos pueden afectar a los resultados del análisis. Las muestras hemolizadas deben rechazarse.

7. REACTIVOS Y MATERIALES

Reactivos suministrados

- BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4
- BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19

Cada vial contiene reactivo en 1 ml de solución salina tamponada con azida sódica al 0,1 %, suficiente para 50 análisis cuando se usa según las instrucciones.

- BD Multitest™ IMK Kit Lysing Solution, concentrada 10X

Si se calculan recuentos absolutos, pida BD Multitest™ IMK Kit con BD Trucount™ Tubes. El reactivo contiene dos cajas de BD Trucount™ Tubes, cada una de ellas contiene dos bolsas. Cada bolsa contiene 25 tubos, suficientes para 25 análisis. Los BD Trucount™ Tubes contienen un sedimento liofilizado de microesferas fluorescentes.

Reactivos y materiales necesarios que no se suministran

- Para los citómetros de flujo BD FACSLytic™:
BD® CS&T Beads (n.º de catálogo 662413, 662414).
BD® FC Beads 7-Color Kit (n.º de catálogo 662961).
- Para los citómetros de flujo BD FACSCanto™ y BD FACSCanto™ II:
BD FACS™ 7-Color Setup Beads (n.º de catálogo 335775).

- Para los citómetros de flujo BD FACSCalibur™:
BD Calibrite™ 3-Color Kit y BD Calibrite™ APC Beads (n.º de catálogo 340486 y 340487).
- Agua (destilada o desionizada) apta para reactivos.
- BD FACSTream™ Sheath Fluid (n.º de catálogo 342003) o equivalente.

PRECAUCIÓN Utilice únicamente BD FACSTream™ Sheath Fluid para diluir BD Calibrite™ 3-Color Beads, BD Calibrite™ APC Beads y BD® CS&T Beads.

NOTA Utilice BD® FC Beads Dilution Buffer, suministrado con el kit, para reconstituir BD® FC Beads.

- BD Vacutainer® EDTA blood collection tubes o equivalentes.
- Tubos de ensayo de poliestireno de 12 x 75 mm desechables con tapón Falcon® o equivalentes (si no se usan BD Trucount™ Tubes).
- Agitador vorticial.
- Micropipeta con puntas.
- Dispensador a granel o pipeta para dispensar 450 µl de BD Multitest™ IMK Kit Lysing Solution 1X.
- Control del proceso de sangre completa lisable, por ejemplo:
 - BD Multi-Check™ Control (n.º de catálogo 349700, 349701 o 349702).
 - BD Multi-Check™ CD4 Low Control (n.º de catálogo 349703, 349704 o 349705).

NOTA Se recomienda analizar controles BD Trucount™ Controls (n.º de catálogo 340335) para verificar la técnica de pipeteado. Los controles son compatibles con el sistema BD FACSCalibur™. No utilice BD Trucount™ Controls con BD FACSCanto™ Clinical Software. Las microesferas de BD Trucount™ Controls pueden afectar a los resultados del recuento absoluto.

8. INSTRUCCIONES DE USO

Dilución de BD Multitest™ IMK Kit Lysing Solution

Diluya el concentrado 10X 1:10 con agua desionizada a temperatura ambiente (20–25 °C). La solución preparada se mantendrá estable durante un mes cuando se almacene en un recipiente de vidrio o de polietileno de alta densidad (HDPE) a temperatura ambiente.

Realización del pipeteado inverso

Cuando se usa un BD Trucount™ Tube, es fundamental realizar un pipeteado exacto. Recomendamos el uso de la técnica de pipeteado inverso para agregar la muestra a un BD Trucount™ Tube. Para el pipeteado inverso, presione el botón hasta la segunda parada. Suelte el botón para ingresar un exceso de muestra a la punta. Presione el botón hasta el primer tope para expulsar un volumen preciso de muestra, de modo que la muestra sobrante se quede en la punta.

Realización del control de calidad

De acuerdo con las directrices del College of American Pathologists (CAP), se recomienda analizar dos niveles de material de control líquido (control de proceso). Es necesario realizar controles al menos una vez cada día cuando se realicen análisis de pacientes.⁵³

Utilice controles comerciales con valores establecidos de porcentaje positivo y recuentos absolutos con cada ensayo a fin de evaluar el rendimiento del sistema. BD ofrece BD Multi-Check™ Control y BD Multi-Check™ CD4 Low Control para que se utilicen como controles de procesos.

Para realizar el control de calidad:

1. Mezcle a conciencia el BD Multi-Check™ Control adecuado, o bien el control de proceso equivalente.

Consulte las instrucciones de uso del control para obtener instrucciones detalladas.

2. Tiña la muestra de control utilizando los reactivos BD Multitest™ IMK tal y como se describe en la siguiente sección.

La muestra de control debe procesarse del mismo modo que las muestras de pacientes para controlar el funcionamiento continuo de todo el proceso analítico.

3. Adquiera la muestra de control teñida en el citómetro de flujo.
4. Inspeccione visualmente el gráfico de puntos de CD45 frente a SSC.

La población de linfocitos debe mostrarse como un grupo compacto y brillante con SSC bajo. Los monocitos y granulocitos deben aparecer también como grupos diferenciados. No continúe con el análisis si las poblaciones son difusas y la diferenciación entre los grupos es escasa o inexistente.

5. Compruebe que los resultados se encuentran dentro de los valores que se muestran en la hoja de valores de análisis.

Tinción de las células

1. Para cada muestra de paciente, etiquete dos tubos de 12 × 75 mm con el número de identificación de la muestra.

Utilice letras como *A* y *B* para diferenciar los dos tubos.

Para realizar recuentos absolutos, etiquete dos BD Trucount™ Tubes en lugar de los tubos de 12 × 75 mm.

NOTA Antes de usarlo, compruebe que el sedimento de microesferas BD Trucount™ esté situado bajo el fiador metálico en el fondo del tubo. En caso contrario, deseche el BD Trucount™ Tube y reemplácelo por otro. No transfiera las microesferas a otro tubo.

2. Pipetee 20 µl de reactivo BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 en el fondo de cada tubo etiquetado como *A*.

- Pipetee 20 μ l de reactivo BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 en el fondo de cada tubo etiquetado como B.

Si utiliza BD Trucount™ Tubes, pipetee el reactivo en la pared del tubo, justo por encima del fiador metálico, sin tocar el sedimento de microesferas.

- Pipetee 50 μ l de la sangre completa con anticoagulante bien mezclada en el fondo de cada tubo.

NOTA Si se utiliza BD Trucount™ Tubes, se recomienda el uso de la técnica de pipeteado inverso para pipetear la muestra en la pared del tubo justo por encima del fiador metálico. Evite que quede sangre en el lateral del tubo. Si queda sangre completa en el lateral del tubo, no se teñirá con el reactivo y podría afectar a los resultados.

- Tape los tubos y agite suavemente en el agitador vorticial para mezclar.
- Incube durante 15–30 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (20–25 °C).
- Añada 450 μ l de BD Multitest™ IMK Kit Lysing Solution 1X a cada tubo.

Evite exponer los tubos a la luz directa. Realice el procedimiento a temperatura ambiente (20–25 °C). Consulte las Precauciones en la página 10 y las Condiciones que causan interferencias en la página 16.

- Tape los tubos y agite suavemente en el agitador vorticial para mezclar.
- Incube durante 15–30 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (20–25 °C).

Las muestras están ya listas para analizarse en el citómetro de flujo. Si las muestras no se analizan inmediatamente después de su tinción, guárdelas en un lugar oscuro a temperatura ambiente (20–25 °C).

Adquisición de muestras

1. Agite a conciencia las células a baja velocidad.

Es importante que reduzca la agregación antes de procesar las muestras en el citómetro de flujo.⁵²

NOTA Si utiliza un Loader, agite los tubos en el agitador vorticial justo antes de colocarlos en las gradillas del Loader.

2. Coloque el tubo en el citómetro y adquiera la muestra.

Antes de la adquisición de muestras, debe ajustarse el umbral para reducir al mínimo los restos celulares y comprobarse que estén incluidas las poblaciones de interés.

3. Analice los datos utilizando el software específico para citómetro.

Consulte las instrucciones de uso del citómetro para obtener más información.

9. RESULTADOS

Los resultados se indican como el porcentaje de células positivas por población de linfocitos o como el número de células positivas por microlitro de sangre (recuento absoluto).

Cálculo de recuentos absolutos

Durante el análisis, el recuento absoluto (células/ μ l) de células positivas en la muestra puede determinarse mediante la comparación entre eventos celulares y eventos de microesferas. Si se utiliza un software de BD específico para citómetro, este determinará los recuentos absolutos.

Para el análisis de datos manual utilizando el software BD CellQuest™ Pro u otro software, se puede calcular el recuento absoluto de la población celular (A) utilizando la ecuación siguiente:

$A = X/Y \times N/V$, donde:

X es el número de eventos celulares positivos.

Y es el número de eventos de microesferas.

N es el número de microesferas por análisis, que se indica en la bolsa de papel de aluminio de BD Trucount™ Tubes y que puede variar de un lote a otro.

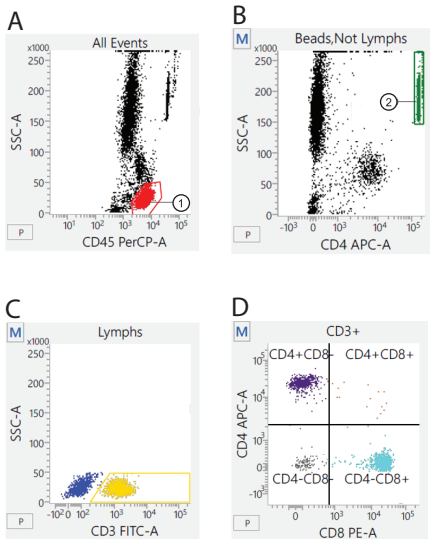
V es el volumen de muestra (50 µl)

Datos representativos

Citómetro de flujo BD FACSLytic™

Se adquirió una muestra de un sujeto adulto normal desde el punto de vista hematológico teñida con BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 en un BD Trucount™ Tube con el software BD FACSuite™ Clinical utilizando un citómetro de flujo BD FACSLytic™. Consulte la Figura 1. El panel A muestra linfocitos CD45⁺ (1) identificados en el gráfico de puntos de CD45 PerCP-A frente a SSC-A. El panel B muestra eventos de microesferas de recuento absoluto BD Trucount™ (2) en el gráfico de puntos de CD4 APC-A frente a SSC-A. El panel C muestra linfocitos T CD3⁺ identificados en el gráfico de puntos de CD3 FITC-A frente a SSC-A. El panel D muestra linfocitos T supresores/ citotóxicos (CD4⁻CD8⁺) y colaboradores/inductores (CD4⁺CD8⁻) en el gráfico de puntos de CD8 PE-A frente a CD4 APC-A.

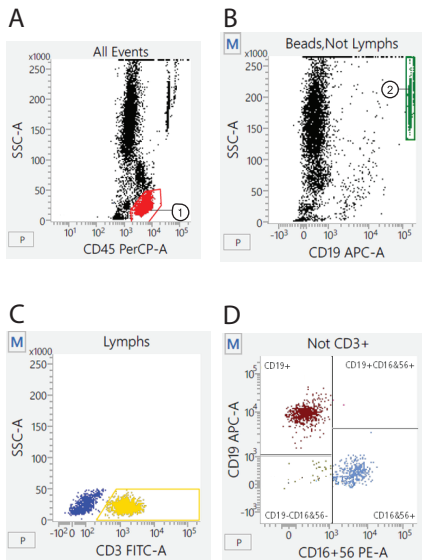
Figura 1 Datos representativos de una muestra de un sujeto adulto normal desde el punto de vista hematológico teñida con BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 en un BD Trucount™ Tube (BD FACSLyric™)



Se adquirió una muestra de un sujeto adulto normal desde el punto de vista hematológico teñida con BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 en un BD Trucount™ Tube con el software BD FACSuite™ Clinical utilizando un citómetro de flujo BD FACSLyric™. Consulte la Figura 2. El panel A muestra linfocitos CD45⁺ (1) identificados en el gráfico de puntos de CD45 PerCP-A frente a SSC-A. El panel B

muestra eventos de microsferas de recuento absoluto BD Trucount™ (2) en el gráfico de puntos de CD19 APC-A frente a SSC-A. El panel C muestra linfocitos T CD3⁺ identificados en el gráfico de puntos de CD3 FITC-A frente a SSC-A. El panel D muestra linfocitos B (CD19⁺) y linfocitos NK (CD16 y CD56⁺) en el gráfico de puntos de CD16+56 PE-A frente a CD19 APC-A.

Figura 2 Datos representativos de una muestra de un sujeto adulto normal desde el punto de vista hematológico teñida con BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 en un BD Trucount™ Tube (BD FACSLyric™)

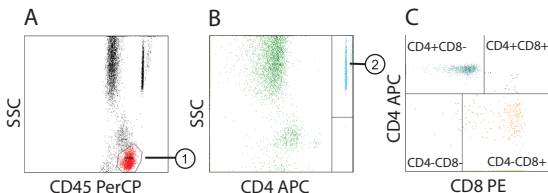


Karina Valeria Traverso
 Karina Valeria Traverso
 Co-Directora Científica / Apoderada
 N.N. 14.753 - M.P. 20.293
 Becton Dickinson Argentina SRL

Citómetro de flujo BD FACSCanto™ II

Se adquirió una muestra de un sujeto adulto normal desde el punto de vista hematológico teñida con BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 en un BD Trucount™ Tube utilizando un citómetro BD FACSCanto™ II. Consulte la Figura 3. El panel A muestra linfocitos CD45⁺ (1) identificados en el gráfico de puntos de CD45 PerCP frente a SSC. El panel B muestra eventos de microesferas de recuento absoluto BD Trucount™ (2) en el gráfico de puntos de CD4 APC frente a SSC. El panel C muestra linfocitos T supresores/citotóxicos (CD4⁻CD8⁺) y colaboradores/inductores (CD4⁺CD8⁻) en el gráfico de puntos de CD8 PE frente a CD4 APC.

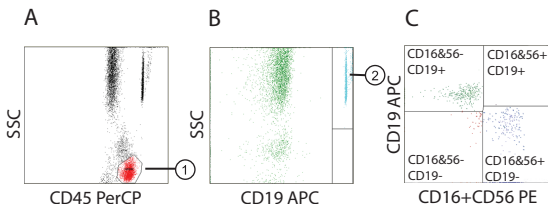
Figura 3 Datos representativos de una muestra de un sujeto adulto normal desde el punto de vista hematológico teñida con BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 en un BD Trucount™ Tube (BD FACSCanto™ II)



Se adquirió una muestra de un sujeto adulto normal desde el punto de vista hematológico teñida con BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 en un BD Trucount™ Tube con un citómetro BD FACSCanto™ II. Consulte la Figura 4. El panel A muestra linfocitos CD45⁺ (1) identificados en el gráfico de puntos de CD45 PerCP frente a SSC. El panel B muestra eventos de microesferas de recuento absoluto BD Trucount™ (2) en el gráfico de puntos de CD19 APC frente a SSC. El panel C muestra linfocitos B (CD16+56⁻CD19⁺) y linfocitos NK

(CD16+56⁺CD19⁻) en el gráfico de puntos de CD16+CD56 PE frente a CD19 APC.

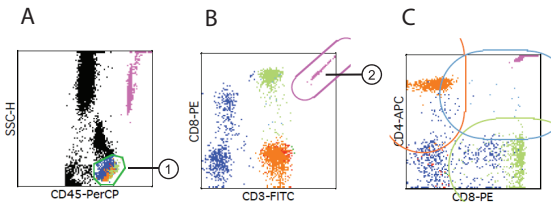
Figura 4 Datos representativos de una muestra de un sujeto adulto normal desde el punto de vista hematológico teñida con BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 en un BD Trucount™ Tube (BD FACSCanto™ II)



Citómetro de flujo BD FACSCalibur™

Se adquirió una muestra de un sujeto adulto normal desde el punto de vista hematológico teñida con BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 en un BD Trucount™ Tube utilizando un citómetro BD FACSCalibur™. Consulte la Figura 5. El panel A muestra linfocitos CD45⁺ (1) identificados en el gráfico de puntos de CD45 PerCP frente a SSC. El panel B muestra eventos de microesferas de recuento absoluto BD Trucount™ (2) en el gráfico de puntos de CD3 FITC frente a CD8 PE. El panel C muestra linfocitos T supresores/citotóxicos (CD4⁻CD8⁺) y colaboradores/inductores (CD4⁺CD8⁻) en el gráfico de puntos de CD8 PE frente a CD4 APC.

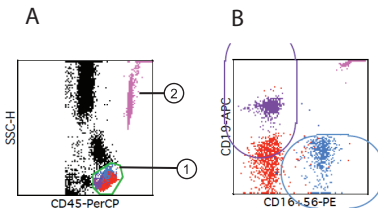
Figura 5 Datos representativos de una muestra de un sujeto adulto normal desde el punto de vista hematológico teñida con BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 en un BD Trucount™ Tube (BD FACSCalibur™)



Se adquirió una muestra de un sujeto adulto normal desde el punto de vista hematológico teñida con BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 en un BD Trucount™ Tube con un citómetro BD FACSCalibur™. Consulte la Figura 6. El panel A muestra linfocitos CD45⁺ (1) y eventos de microesferas de recuento absoluto BD Trucount™ (2) en el gráfico de puntos de CD45 PerCP frente a SSC. El panel B muestra linfocitos B (CD19⁺) y linfocitos NK (CD16⁺, CD56⁺ o ambos) identificados en el gráfico de puntos de CD16+CD56 PE frente a CD19 APC.


Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - H.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

Figura 6 Datos representativos de una muestra de un sujeto adulto normal desde el punto de vista hematológico teñida con BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 en un BD Trucount™ Tube (BD FACSCalibur™)



10. LIMITACIONES

- Es necesario que los laboratorios establezcan sus propios intervalos de referencia normales para los parámetros de BD Multitest™ IMK Kit a los que puedan afectar el sexo o la edad del paciente, así como la técnica utilizada en la preparación. La raza del paciente⁵⁴ y las variaciones individuales de la expresión del epítipo⁵⁵ también pueden influir, aunque aún no se dispone de suficientes datos para respaldar esta afirmación. Es necesario conocer la edad, el sexo, las características clínicas y la raza de los pacientes para determinar un intervalo de referencia.⁵⁶ Los intervalos de referencia que se ofrecen son de carácter meramente informativo.
- BD Multitest™ IMK Kit no ha sido validado por BD Biosciences para utilizarse con anticoagulantes líquidos con heparina o ácido citrato dextrosa (ACD) en la determinación de recuentos absolutos con BD Trucount™ Tubes.
- BD Multitest™ IMK Kit no está diseñado para la discriminación de muestras por la presencia de células leucémicas, ni para utilizarse en muestras fenotípicas de pacientes con leucemia.

- Los recuentos absolutos calculados no son comparables entre laboratorios en los que se utilizan equipos de fabricantes diferentes.

11. VALORES ESPERADOS

Se determinaron los intervalos de referencia para el BD Multitest™ IMK Kit con y sin BD Trucount™ Tubes en un estudio utilizando el citómetro de flujo BD FACSLyric™.⁵⁶ Los sujetos del estudio eran adultos de entre 19 y 80 años de edad con una hematología normal. Se realizaron estudios similares en diferentes momentos utilizando otros citómetros de flujo BD con muestras de distintas poblaciones, que pueden contribuir a diferencias en los intervalos de referencia entre estudios.⁶⁰⁻⁶² Consulte la primera limitación en la sección anterior para obtener más información sobre los intervalos de referencia.

Tabla 2 Intervalos de referencia representativos para BD Multitest™ IMK Kit

Subpoblación de linfocitos	N ^a	Unidades	Media	Intervalo del 95 %
CD3 ⁺ promedio	130	%	71,88	56,86-82,5
		células/μl	1555,87	827-2547
CD3 ⁺ CD4 ⁺	130	%	46,51	32,42-63,19
		células/μl	1003,50	488-1711
CD3 ⁺ CD8 ⁺	130	%	23,25	8,99-38,99
		células/μl	514,19	154-1097
CD3 ⁻ CD19 ⁺	130	%	13,69	5,14-22,96
		células/μl	292,73	60-551
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	130	%	13,25	5,42-29,65
		células/μl	281,04	102-617

a. N = número de muestras

12. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Citómetro de flujo BD FACSLyric™

Comparación de métodos (citómetro de flujo BD FACSLyric™)

Los porcentajes y recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos se determinaron con los reactivos BD Multitest™ IMK (CD3/CD8/CD45/CD4 y CD3/CD16+CD56/CD45/CD19) en BD Trucount™ Tubes y se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSLyric™ utilizando el software BD FACSuite™ Clinical. Los resultados se compararon con los resultados de los reactivos analizados en el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II utilizando BD FACSCanto™ Clinical Software.

Se tomaron muestras de sangre completa aleatoriamente en cinco centros de investigación clínica. Las estadísticas de la comparación de métodos se muestran para todas las subpoblaciones de células.⁵⁸ Consulte la Tabla 3.

Tabla 3 Estadísticas de comparación de métodos para subpoblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLyric™)

Subpoblación de linfocitos	N	Unidades	R ²	Pendiente	Intersección	Intervalo
CD3 ⁺ promedio	336	%	0,99	1,00	0,47	1,34–95,78
		células/μl	0,99	1,04	1,43	6–6499
CD3 ⁺ CD4 ⁺	336	%	1,00	1,01	-0,26	0,12–84,65
		células/μl	0,99	1,02	-0,04	1–3194
CD3 ⁺ CD8 ⁺	336	%	0,99	1,00	-0,08	0,26–82,93
		células/μl	0,99	1,02	-0,59	1–5774
CD3 ⁻ CD19 ⁺	336	%	1,00	1,02	-0,24	0,00–92,43
		células/μl	1,00	1,02	-0,16	0–2770

Tabla 3 Estadísticas de comparación de métodos para subpoblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLytic™)

Subpoblación de linfocitos	N	Unidades	R ²	Pendiente	Intersección	Intervalo
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	336	%	0,99	1,00	-0,85	1,51-87,67
		células/μl	0,99	0,96	-3,95	14-1502

Comparación de métodos (citómetro de flujo BD FACSLytic™ con el sistema BD FACSDuet™)

Se tomaron muestras de sangre completa en tres centros de investigación clínica. Una alícuota de cada muestra se tiñó con cada uno de los reactivos BD Multitest™ IMK (CD3/CD8/CD45/CD4 y CD3/CD16+CD56/CD45/CD19) en BD Trucount™ Tube utilizando el sistema BD FACSDuet™. Las muestras teñidas se transfirieron automáticamente a un citómetro de flujo BD FACSLytic™ integrado y se adquirieron mediante un BD FACS™ Universal Loader y el software BD FACSuite™ Clinical. Una segunda alícuota de cada muestra se tiñó manualmente con los reactivos en un BD Trucount™ Tube. Las muestras teñidas se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSLytic™ autónomo mediante un BD FACS™ Universal Loader y el software BD FACSuite™ Clinical.

Se compararon los resultados entre las muestras preparadas con el sistema BD FACSDuet™ y las muestras preparadas manualmente.⁵⁶ Consulte la Tabla 4.

Tabla 4 Estadísticas de comparación de métodos para subpoblaciones de linfocitos (BD FACSLytic™ con BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	N	Unidades	R ²	Pendiente	Intersección	Intervalo
CD3 ⁺ promedio	373	%	0,99	0,99	0,41	45,31–99,14
		células/μl	0,99	1,00	0,85	89–11376
CD3 ⁺ CD4 ⁺	373	%	0,99	1,00	-0,02	0,37–91,86
		células/μl	0,99	1,00	-0,15	4–7911
CD3 ⁺ CD8 ⁺	373	%	0,99	0,99	-0,01	2,52–86,68
		células/μl	0,98	0,99	3,16	52–5796
CD3 ⁻ CD19 ⁺	373	%	0,97	1,00	-0,03	0,17–31,8
		células/μl	0,98	0,99	-0,08	8–2236
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	373	%	0,98	1,00	0,23	0,52–44,27
		células/μl	0,98	1,02	0,28	9–2188

Precisión intracentro (citómetro de flujo BD FACSLytic™)

Se llevó a cabo un estudio de 21 días de duración en un centro

(BD Biosciences) para evaluar la precisión intracentro.⁵⁹ Se realizaron estimaciones de la precisión de enumeración de porcentajes y recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos con cuatro citómetros de flujo BD FACSLytic™ y cuatro operadores, adquiriendo dos concentraciones de analito, CD-Chex Plus® CD4 Low Control y CD-Chex Plus® Control, teñidas por duplicado con cuatro lotes de reactivos BD Multitest™ IMK (CD3/CD8/CD45/CD4 y CD3/CD16+CD56/CD45/CD19). Se analizaron dos ensayos distintos durante cada uno de los 21 días de prueba, con un total de 42 ensayos.


 Karina Valeria Traverso
 Co-Directora Técnica / Apoderada
 M.N. 14.733 - H.P. 20.293
 Becton Dickinson Argentina SRL

En las siguientes tablas se presentan las desviaciones estándar (DE) y los coeficientes de variación (CV) de la precisión intracentro y la repetibilidad de los porcentajes y recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos, respectivamente.

Tabla 5 Precisión intracentro de porcentajes de subpoblaciones de linfocitos a concentración baja de analito (CDL^a) (citómetro de flujo BD FACSLyric™)

Subpoblación de linfocitos	Media (%)	DE (repetibilidad)	DE (precisión intracentro)
CD3 ⁺ promedio	57,25	0,83	0,90
CD3 ⁺ CD4 ⁺	11,66	0,62	0,64
CD3 ⁺ CD8 ⁺	40,36	1,04	1,06
CD3 ⁻ CD19 ⁺	21,70	0,79	0,82
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	19,40	0,84	0,85

a. CDL = CD-Chex Plus CD4 Low Control

Tabla 6 Precisión intracentro de porcentajes de subpoblaciones de linfocitos a concentración normal de analito (CDN^a) (citómetro de flujo BD FACSLyric™)

Subpoblación de linfocitos	Media (%)	DE (repetibilidad)	DE (precisión intracentro)
CD3 ⁺ promedio	76,77	0,59	0,62
CD3 ⁺ CD4 ⁺	50,74	1,01	1,02
CD3 ⁺ CD8 ⁺	22,22	0,80	0,80
CD3 ⁻ CD19 ⁺	12,09	0,55	0,55
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	10,34	0,59	0,59

a. CDN = CD-Chex Plus Control

Tabla 7 Precisión intracentro de recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos a concentración baja de analito (CDL)
(citómetro de flujo BD FACSLytic™)

Subpoblación de linfocitos	Media (células/μl)	% CV (repetibilidad)	% CV (precisión intracentro)
CD3 ⁺ promedio	870,51	3,15	3,29
CD3 ⁺ CD4 ⁺	176,91	6,59	6,67
CD3 ⁺ CD8 ⁺	612,12	4,55	4,65
CD3 ⁻ CD19 ⁺	330,87	5,22	5,35
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	295,88	6,03	6,21

Tabla 8 Precisión intracentro de recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos a concentración normal de analito (CDN)
(citómetro de flujo BD FACSLytic™)

Subpoblación de linfocitos	Media (células/μl)	% CV (repetibilidad)	% CV (precisión intracentro)
CD3 ⁺ promedio	1733,81	3,05	3,21
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1142,52	4,04	4,18
CD3 ⁺ CD8 ⁺	500,42	5,56	5,67
CD3 ⁻ CD19 ⁺	273,84	6,02	6,16
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	234,38	7,41	7,52

Precisión intracentro (citómetro de flujo BD FACSLytic™ con sistema BD FACSDuet™)

Se llevó a cabo un estudio de 21 días de duración en un centro (BD Biosciences) para evaluar la precisión intracentro.⁵⁷ Se realizaron estimaciones de la precisión de enumeración de porcentajes y recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos con tres sistemas BD FACSDuet™, cada uno integrado con un citómetro de flujo BD FACSLytic™ y, al menos, tres operadores, adquiriendo dos concentraciones de analito, CD-Chex Plus CD4 Low Control y CD-Chex Plus Control, teñidas por duplicado con tres lotes de reactivos BD Multitest™ IMK (CD3/CD8/CD45/CD4 y CD3/CD16+CD56/CD45/CD19). Se analizaron dos ensayos distintos durante cada uno de los 21 días de prueba, con un total de 42 ensayos.

En las siguientes tablas se presentan las desviaciones estándar (DE) y los coeficientes de variación (CV) de la precisión intracentro y la repetibilidad de los porcentajes y recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos, respectivamente.

Tabla 9 Precisión intracentro de porcentajes de subpoblaciones de linfocitos a concentración baja de analito (CDL^a) (BD FACSLytic™ con BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	Media (%)	DE (repetibilidad)	DE (precisión intracentro)
CD3 ⁺ promedio	63,67	0,81	0,82
CD3 ⁺ CD4 ⁺	14,94	0,68	0,70
CD3 ⁺ CD8 ⁺	44,04	1,11	1,12
CD3 ⁻ CD19 ⁺	18,24	0,71	0,72
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	16,87	0,72	0,74

a. CDL = CD-Chex Plus CD4 Low Control

Tabla 10 Precisión intracentro de porcentajes de subpoblaciones de linfocitos a concentración normal de analito (CDN^a) (BD FACSLytic™ con BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	Media (%)	DE (repetibilidad)	DE (precisión intracentro)
CD3 ⁺ promedio	77,45	0,64	0,64
CD3 ⁺ CD4 ⁺	48,79	0,96	0,96
CD3 ⁺ CD8 ⁺	26,77	0,91	0,91
CD3 ⁻ CD19 ⁺	11,93	0,64	0,64
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	9,98	0,55	0,55

a. CDN = CD-Chex Plus Control

Tabla 11 Precisión intracentro de recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos a concentración baja de analito (CDL) (BD FACSLytic™ con BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	Media (células/μl)	% CV (repetibilidad)	% CV (precisión intracentro)
CD3 ⁺ promedio	737,07	3,10	4,20
CD3 ⁺ CD4 ⁺	173,18	5,97	6,57
CD3 ⁺ CD8 ⁺	510,44	4,40	5,28
CD3 ⁻ CD19 ⁺	210,89	5,69	6,37
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	195,06	5,40	6,21

Tabla 12 Precisión intracentro de recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos a concentración normal de analito (CDN)
(BD FACSLyric™ con BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	Media (células/ μ l)	% CV (repetibilidad)	% CV (precisión intracentro)
CD3 ⁺ promedio	1751,12	3,99	6,27
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1103,49	5,23	6,88
CD3 ⁺ CD8 ⁺	605,62	6,23	7,70
CD3 ⁻ CD19 ⁺	269,47	6,93	8,53
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	225,59	6,95	8,45

Reproducibilidad entre laboratorios (citómetro de flujo BD FACSLyric™)

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la reproducibilidad entre laboratorios. Se facilitó un solo lote de cada control de proceso, CD-Chex Plus CD4 Low Control y CD-Chex Plus Control, a cada uno de los cuatro laboratorios clínicos. Las muestras de control se tiñeron mediante los reactivos BD Multitest™ IMK. Se analizaron dos ensayos distintos durante cada uno de cinco días de prueba no consecutivos, con un total de diez ensayos.

En las siguientes tablas se indican las desviaciones estándar (DE) y los coeficientes de variación (CV) de la reproducibilidad (precisión total) de los porcentajes y recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos, respectivamente.

Tabla 13 Reproducibilidad de los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos a concentración baja de analito (CDL) entre laboratorios (citómetro de flujo BD FACSLytic™)

Subpoblación de linfocitos	Media (%)	DE
CD3 ⁺ promedio	57,12	1,00
CD3 ⁺ CD4 ⁺	12,12	0,61
CD3 ⁺ CD8 ⁺	40,74	1,12
CD3 ⁻ CD19 ⁺	21,74	0,83
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	19,44	1,06

Tabla 14 Reproducibilidad de los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos a concentración normal de analito (CDN) entre laboratorios (citómetro de flujo BD FACSLytic™)

Subpoblación de linfocitos	Media (%)	DE
CD3 ⁺ promedio	76,74	0,77
CD3 ⁺ CD4 ⁺	51,67	1,58
CD3 ⁺ CD8 ⁺	23,23	0,85
CD3 ⁻ CD19 ⁺	12,02	0,66
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	10,30	0,62

Tabla 15 Reproducibilidad de los recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos a concentración baja de analito (CDL) entre laboratorios (citómetro de flujo BD FACSLytic™)

Subpoblación de linfocitos	Media (células/ μ l)	% CV
CD3 ⁺ promedio	883,06	4,18
CD3 ⁺ CD4 ⁺	187,01	7,30
CD3 ⁺ CD8 ⁺	628,51	5,23
CD3 ⁻ CD19 ⁺	336,79	5,71
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	301,25	7,40

Tabla 16 Reproducibilidad de los recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos a concentración normal de analito (CDN) entre laboratorios (citómetro de flujo BD FACSLytic™)

Subpoblación de linfocitos	Media (células/ μ l)	% CV
CD3 ⁺ promedio	1747,70	3,98
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1177,59	5,17
CD3 ⁺ CD8 ⁺	529,63	6,05
CD3 ⁻ CD19 ⁺	273,58	7,23
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	234,28	7,50

Reproducibilidad entre laboratorios (citómetro de flujo BD FACSLytic™ con el sistema BD FACSDuet™)

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la reproducibilidad entre laboratorios. Se facilitó un solo lote de cada control de proceso, CD-Chex Plus CD4 Low Control y CD-Chex Plus Control, a cada uno de los tres centros clínicos. Las muestras de control se tiñeron utilizando tres lotes de reactivos BD Multitest™ IMK (CD3/CD8/CD45/CD4 y CD3/CD16+CD56/CD45/CD19) y un lote de BD Trucount™ Tubes, con el sistema BD FACSDuet™ y se

transfirieron automáticamente a un citómetro de flujo BD FACSLyric™ integrado y se adquirieron mediante un BD FACST™ Universal Loader. Se realizaron dos ensayos separados cada día. Se analizaron los resultados obtenidos durante 15 días de ensayos no consecutivos.

En las siguientes tablas se indican las desviaciones estándar (DE) y los coeficientes de variación (CV) de la reproducibilidad (precisión total) de los porcentajes y recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos, respectivamente.

Tabla 17 Reproducibilidad de los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos a concentración baja de analito (CDL) entre laboratorios (BD FACSLyric™ con BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	Media (%)	DE
CD3 ⁺ promedio	57,11	0,77
CD3 ⁺ CD4 ⁺	9,97	0,61
CD3 ⁺ CD8 ⁺	42,94	1,05
CD3 ⁻ CD19 ⁺	21,46	0,84
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	20,16	0,85

Tabla 18 Reproducibilidad de los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos a concentración normal de analito (CDN) entre laboratorios (BD FACSLyric™ con BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	Media (%)	DE
CD3 ⁺ promedio	75,97	0,60
CD3 ⁺ CD4 ⁺	49,83	0,91
CD3 ⁺ CD8 ⁺	24,60	0,73
CD3 ⁻ CD19 ⁺	12,19	0,57
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	11,17	0,58

Tabla 19 Reproducibilidad de los recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos a concentración baja de analito (CDL) entre laboratorios (BD FACSLyric™ con BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	Media (células/ μ l)	% CV
CD3 ⁺ promedio	958,18	5,68
CD3 ⁺ CD4 ⁺	167,16	8,47
CD3 ⁺ CD8 ⁺	719,77	6,68
CD3 ⁻ CD19 ⁺	360,46	7,21
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	338,44	7,53

Tabla 20 Reproducibilidad de los recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos a concentración normal de analito (CDN) entre laboratorios (BD FACSLyric™ con BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	Media (células/ μ l)	% CV
CD3 ⁺ promedio	1980,54	5,64
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1303,23	6,62
CD3 ⁺ CD8 ⁺	643,31	7,28
CD3 ⁻ CD19 ⁺	317,00	8,36
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	290,39	8,15

Repetibilidad en la sangre completa (citómetro de flujo BD FACSLyric™)

Se realizó un estudio de repetibilidad en sangre completa para demostrar la repetibilidad del sistema utilizando 53 muestras de donantes. Cada muestra de donante se tiñó por duplicado con los reactivos BD Multitest™ IMK (CD3/CD8/CD45/CD4 y CD3/CD16+CD56/CD45/CD19) en BD Trucount™ Tubes y se procesó en 12 instrumentos, con un total de 24 ensayos por muestra para cada reactivo.

Tabla 21 Repetibilidad de los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos en sangre completa (citómetro de flujo BD FACSLyric™)

Subpoblación de linfocitos	Media (%)	Repetibilidad dentro del ensayo (DE)	Repetibilidad total (DE)
CD3 ⁺ promedio	73,59	0,69	0,69
CD3 ⁺ CD4 ⁺	33,46	0,83	0,83
CD3 ⁺ CD8 ⁺	37,93	0,93	0,93
CD3 ⁻ CD19 ⁺	13,02	0,67	0,67
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	12,37	0,71	0,71

Tabla 22 Repetibilidad de los recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos en sangre completa (citómetro de flujo BD FACSLyric™)

Subpoblación de linfocitos	Media (células/μl)	Repetibilidad dentro del ensayo (% CV)	Repetibilidad total (% CV)
CD3 ⁺ promedio	1398,45	3,21	3,35
CD3 ⁺ CD4 ⁺	633,59	5,32	5,40
CD3 ⁺ CD8 ⁺	726,59	5,42	5,53
CD3 ⁻ CD19 ⁺	229,21	7,32	7,47
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	215,01	7,84	7,94

Repetibilidad en la sangre completa (citómetro de flujo BD FACSLyric™ con sistema BD FACSDuet™)

Se realizó un estudio de repetibilidad en sangre completa para demostrar la repetibilidad del sistema utilizando 27 muestras de donantes. Cada muestra de donante se tiñó por duplicado con 3 lotes de reactivos BD Multitest™ IMK (CD3/CD8/CD45/CD4 y CD3/CD16+CD56/CD45/CD19) en BD Trucount™ Tubes y se procesó en 3 instrumentos BD FACSDuet™, cada uno integrado a un citómetro de flujo BD FACSLyric™, con un total de 18 ensayos por muestra.

Tabla 23 Repetibilidad de los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos en sangre completa (BD FACSLyric™ con BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	Media (%)	Repetibilidad dentro del ensayo (DE)	Repetibilidad total (DE)
CD3 ⁺ promedio	76,67	0,74	0,75
CD3 ⁺ CD4 ⁺	31,18	0,89	0,89
CD3 ⁺ CD8 ⁺	44,04	1,01	1,05
CD3 ⁻ CD19 ⁺	11,97	0,67	0,67
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	10,66	0,81	0,83

Tabla 24 Repetibilidad de los recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos en sangre completa (BD FACSLyric™ con BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	Media (células/ μ l)	Repetibilidad dentro del ensayo (% CV)	Repetibilidad total (% CV)
CD3 ⁺ promedio	1575,57	3,45	3,85
CD3 ⁺ CD4 ⁺	636,55	5,12	5,38
CD3 ⁺ CD8 ⁺	905,37	5,17	5,65

Tabla 24 Repetibilidad de los recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos en sangre completa (BD FACSLyric™ con BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	Media (células/ μ l)	Repetibilidad dentro del ensayo (% CV)	Repetibilidad total (% CV)
CD3 ⁻ CD19 ⁺	246,37	7,55	7,80
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	217,20	10,46	11,02

Estabilidad (citómetro de flujo BD FACSLyric™ con y sin sistema BD FACSDuet™)

Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad de la muestra de sangre y de la muestra de sangre teñida con los reactivos BD Multitest™ IMK (CD3/CD8/CD45/CD4 y CD3/CD16+CD56/CD45/CD19) en BD Trucount™ Tubes. En el estudio se midió lo siguiente:

- Cambios asociados al almacenamiento de la sangre completa antes de la tinción.
- Cambios producidos como resultado del tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de los datos.
- Efecto combinado de las dos situaciones.

Las muestras de sangre completa se analizaron en las 51 horas posteriores a la extracción y las muestras teñidas se analizaron en las 26 horas posteriores a la tinción. Todas las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (20–25 °C) antes de la tinción o la adquisición de datos.

En función de los resultados de este estudio, recomendamos realizar la tinción de las muestras en un plazo de 48 horas tras la extracción y analizarlas en un plazo de 24 horas tras la tinción. La estabilidad de la muestra y la estabilidad de la muestra teñida se aplican al uso en un citómetro de flujo BD FACSLyric™ con y sin integración con un sistema BD FACSDuet™.

Linealidad (citómetro de flujo BD FACSLyric™ con y sin sistema BD FACSDuet™)

La linealidad de BD Multitest™ IMK Kit se evaluó para el citómetro de flujo BD FACSLyric™, con y sin un sistema BD FACSDuet™ integrado, utilizando mediciones por triplicado de 11 concentraciones de leucocitos espaciadas equitativamente. Se observó que las subpoblaciones de linfocitos eran lineales dentro de los intervalos siguientes. Consulte la Tabla 25.

Tabla 25 Intervalos lineales de subpoblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLyric™ con y sin BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	Intervalo (células/ μ l)	
	BD FACSLyric™	BD FACSLyric™ con BD FACSDuet™
CD3 ⁺ promedio	5–5181	4–5310
CD3 ⁺ CD4 ⁺	5–2931	3–3016
CD3 ⁺ CD8 ⁺	7–3480	2–3130
CD3 ⁻ CD19 ⁺	1–1008	0–2237
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	2–1396	1–1419

Intervalo de medición analítico (citómetro de flujo BD FACSLyric™ con y sin sistema BD FACSDuet™).

Se determinó el intervalo de medición analítico (AMR) para BD Multitest™ IMK Kit en el citómetro de flujo BD FACSLyric™. El límite inferior del AMR se determinó en base a los resultados de un estudio de límite cuantitativo (LoQ), mientras que el límite superior del AMR se determinó según los resultados del estudio de comparación de métodos.

Tabla 26 AMR de subpoblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLytic™ con y sin sistema BD FACSDuet™)

Subpoblación de linfocitos	Intervalo (células/μl)
CD3 ⁺ promedio	14–5000
CD3 ⁺ CD4 ⁺	10–3000
CD3 ⁺ CD8 ⁺	11–3000
CD3 ⁻ CD19 ⁺	14–2000
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	10–1200

Citómetro de flujo BD FACSCanto™ II

Comparación de métodos (citómetro de flujo BD FACSCanto™ II)

El porcentaje y los recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos se determinaron con los reactivos BD Multitest™ IMK (CD3/CD8/CD45/CD4 y CD3/CD16+CD56/CD45/CD19) en BD Trucount™ Tubes y se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II utilizando BD FACSCanto™ Clinical Software versión 2.1. Los resultados se compararon con los resultados de los reactivos analizados en el citómetro de flujo BD FACSCanto™ utilizando BD FACSCanto™ Clinical Software versión 2.0.

Se tomaron muestras de sangre completa aleatoriamente en un laboratorio clínico. Las estadísticas de regresión se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27 Análisis de regresión de recuentos absolutos y porcentajes de subpoblaciones (citómetro de flujo BD FACSCanto™ II)

Subpoblación de linfocitos	N	Unidades	R ²	Pendiente	Intersección	Intervalo
CD3 ⁺ promedio	104	células/μl	0,991	0,97	27,59	221–3873
		%	0,984	0,97	2,72	52–92
CD3 ⁺ CD4 ⁺	104	células/μl	0,986	0,95	18,25	11–1905
		%	0,994	1,01	0,20	2–57
CD3 ⁺ CD8 ⁺	104	células/μl	0,988	0,95	28,36	68–3577
		%	0,993	1,00	0,34	11–81
CD3 ⁻ CD19 ⁺	104	células/μl	0,979	0,97	2,37	0–834
		%	0,986	0,97	0,32	0–38
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	104	células/μl	0,961	0,88	10,56	20–606
		%	0,957	0,93	0,19	2–32

Precisión (citómetro de flujo BD FACSCanto™ II)

Se realizaron estimaciones de la precisión en un centro (BD Biosciences) utilizando dos muestras procesadas por duplicado con dos niveles distintos de concentración de analito. Tres operadores distintos procesaron las muestras en tres instrumentos diferentes (un operador y un instrumento por día). Se analizaron dos ensayos distintos durante cada uno de los 21 días de prueba, con un total de 42 ensayos. Se realizó una calibración con BD FACSTM 7-Color Setup Beads antes de cada ensayo para un total de 42 ensayos. Durante el estudio se utilizaron un lote de reactivo y un lote de calibrador.

En las siguientes tablas se presentan las DE y los CV de la precisión intradispositivo y la repetibilidad de los porcentajes y recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos, respectivamente.

Tabla 28 Precisión de porcentajes de subpoblaciones de linfocitos a concentración baja de analito (CDL^a) (citómetro de flujo BD FACSCanto™ II)

Subpoblación de linfocitos (%)	Media	DE (repetibilidad)	DE (precisión intradispositivo)
CD3 ⁺ promedio	54,1	0,96	0,98
CD3 ⁺ CD4 ⁺	10,3	0,53	0,53
CD3 ⁺ CD8 ⁺	43,2	1,33	1,34
CD3 ⁻ CD19 ⁺	26,1	0,86	0,86
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	18,2	0,87	0,87

a. CDL = CD-Chex Plus CD4 Low Control

Tabla 29 Precisión de porcentajes de subpoblaciones de linfocitos a concentración normal de analito (CDC^a) (citómetro de flujo BD FACSCanto™ II)

Subpoblación de linfocitos (%)	Media	DE (repetibilidad)	DE (precisión intradispositivo)
CD3 ⁺ promedio	73,0	0,63	0,67
CD3 ⁺ CD4 ⁺	46,8	0,81	0,82
CD3 ⁺ CD8 ⁺	25,4	0,78	0,80
CD3 ⁻ CD19 ⁺	15,4	0,54	0,56
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	10,6	0,51	0,52

a. CDC = CD-Chex Plus Control

Tabla 30 Precisión de recuentos absolutos a concentración baja de analito (CDL)
(citómetro de flujo BD FACSCanto™ II)

Subpoblación de linfocitos (células/ μ l)	Media	% CV (repetibilidad)	% CV (precisión intradispósito)
CD3 ⁺ promedio	1086,0	3,5	3,6
CD3 ⁺ CD4 ⁺	205,6	5,9	5,9
CD3 ⁺ CD8 ⁺	866,0	3,8	3,9
CD3 ⁻ CD19 ⁺	526,1	6,2	6,4
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	367,1	5,9	6,1

Tabla 31 Precisión de recuentos absolutos a concentración normal de analito (CDC)
(citómetro de flujo BD FACSCanto™ II)

Subpoblación de linfocitos (células/ μ l)	Media	% CV (repetibilidad)	% CV (precisión intradispósito)
CD3 ⁺ promedio	2105,4	2,7	2,9
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1347,1	3,6	3,8
CD3 ⁺ CD8 ⁺	731,4	4,7	4,7
CD3 ⁻ CD19 ⁺	443,5	5,5	5,6
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	306,3	6,0	6,0

Estabilidad (citómetro de flujo BD FACSCanto™ II)

La estabilidad de los reactivos BD Multitest™ IMK (CD3/CD8/CD45/CD4 y CD3/CD16+CD56/CD45/CD19) en BD Trucount™ Tubes se evaluó estudiando lo siguiente:

- Cambios asociados al almacenamiento de la sangre completa antes de la tinción.
- Cambios producidos como resultado del tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de los datos.
- Efecto combinado de las dos situaciones.

Las muestras de sangre completa se analizaron en las 48 horas posteriores a la extracción y las muestras teñidas se analizaron en las 24 horas posteriores a la tinción. Todas las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (20–25 °C) antes de la tinción o la adquisición de datos.

En función de los resultados de este estudio, recomendamos realizar la tinción de las muestras en un plazo de 48 horas tras la extracción y analizarlas en un plazo de 24 horas tras la tinción.

Linealidad (citómetro de flujo BD FACSCanto™ II)

La linealidad de BD Multitest™ IMK Kit se evaluó para el sistema BD FACSCanto™ II dentro de un intervalo de leucocitos de 0 a $3,3 \times 10^4$ leucocitos/ μ l. Se observó que los resultados eran lineales dentro de los intervalos siguientes.

Subpoblación	Intervalo (células/ μ l)
CD3	6–5998
CD4	1–3669
CD8	2–2324
CD19	1–857
CD16+CD56	1–447

Citómetro de flujo BD FACSCanto™

Comparación de métodos (citómetro de flujo BD FACSCanto™)

El porcentaje y los recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos se determinaron con los reactivos BD Multitest™ IMK (CD3/CD8/CD45/CD4 y CD3/CD16+CD56/CD45/CD19) en BD Trucount™ Tubes y se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSCanto™ utilizando BD FACSCanto™ Clinical Software versión 2.0. Los resultados se compararon con los resultados de los reactivos analizados en el

citómetro de flujo BD FACSCalibur™ utilizando el software BD Multiset™. Consulte la Tabla 32.

Tabla 32 Análisis de regresión de recuentos absolutos y porcentajes de subpoblaciones (citómetro de flujo BD FACSCanto™)

Subpoblación de linfocitos	N	Unidad	R	Pendiente	Intersección	Intervalo
CD3 ⁺ promedio	108	células/μl	0,987	0,99	-6,27	75-5257
		%	0,993	1,00	-0,17	40-93
CD3 ⁺ CD4 ⁺	108	células/μl	0,991	0,97	10,80	3-3211
		%	0,998	0,99	0,26	1-70
CD3 ⁺ CD8 ⁺	108	células/μl	0,983	0,96	24,60	68-2754
		%	0,996	1,00	0,27	10-81
CD3 ⁻ CD19 ⁺	108	células/μl	0,990	1,02	-7,93	0-2527
		%	0,994	0,99	-0,05	0-42
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	108	células/μl	0,981	0,95	10,80	11-1374
		%	0,989	1,00	0,39	2-45

Precisión (citómetro de flujo BD FACSCanto™)

Se realizaron estimaciones de la precisión en un centro (BD Biosciences) utilizando dos muestras procesadas por duplicado con dos niveles distintos de concentración de analito. Tres operadores distintos procesaron las muestras en tres instrumentos diferentes (un operador y un instrumento por día). Se analizaron dos ensayos distintos durante cada uno de los 20 días de prueba, con un total de 40 ensayos. Se realizó una calibración con BD FACST™ 7-Color Setup Beads antes de cada ensayo para un total de 40 ensayos. Durante el estudio se utilizaron un lote de reactivo y un lote de calibrador.

En las siguientes tablas se presentan las DE y los CV de la precisión intradispositivo y la repetibilidad de los porcentajes y recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos, respectivamente.

Tabla 33 Precisión de porcentajes de subpoblaciones de linfocitos a concentración baja de analito (MCL^a) (citómetro de flujo BD FACSCanto™)

Subpoblación de linfocitos (%)	Media	DE (repetibilidad)	DE (precisión intradispositivo)
CD3 ⁺ promedio	57,5	1,16	1,22
CD3 ⁺ CD4 ⁺	17,6	0,73	0,77
CD3 ⁺ CD8 ⁺	39,1	0,97	1,17
CD3 ⁻ CD19 ⁺	20,5	0,70	1,05
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	18,6	1,03	1,14

a. MCL = BD Multi-Check™ CD4 Low Control

Tabla 34 Precisión de porcentajes de subpoblaciones de linfocitos a concentración normal de analito (MCN^a) (citómetro de flujo BD FACSCanto™)

Subpoblación de linfocitos (%)	Media	DE (repetibilidad)	DE (precisión intradispositivo)
CD3 ⁺ promedio	69,9	1,15	1,21
CD3 ⁺ CD4 ⁺	50,3	1,04	1,18
CD3 ⁺ CD8 ⁺	19,8	1,03	1,15
CD3 ⁻ CD19 ⁺	13,6	0,68	0,77
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	13,7	0,89	1,03

a. MCN = BD Multi-Check™ Control

Tabla 35 Precisión de recuentos absolutos a concentración baja de analito (MCL) (citómetro de flujo BD FACSCanto™)

Subpoblación de linfocitos (células/μl)	Media	% CV (repetibilidad)	% CV (precisión intradispósito)
CD3 ⁺ promedio	307,4	3,2	4,1
CD3 ⁺ CD4 ⁺	94,9	5,8	6,5
CD3 ⁺ CD8 ⁺	210,7	5,1	5,8
CD3 ⁻ CD19 ⁺	108,5	4,9	7,1
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	98,6	6,6	8,2

Tabla 36 Precisión de recuentos absolutos a concentración normal de analito (MCN) (citómetro de flujo BD FACSCanto™)

Subpoblación de linfocitos (células/μl)	Media	% CV (repetibilidad)	% CV (precisión intradispósito)
CD3 ⁺ promedio	743,9	3,9	4,8
CD3 ⁺ CD4 ⁺	539,4	5,7	5,9
CD3 ⁺ CD8 ⁺	212,8	6,4	7,1
CD3 ⁻ CD19 ⁺	143,3	7,0	7,8
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	145,0	8,0	9,9

Estabilidad (citómetro de flujo BD FACSCanto™)

La estabilidad de los reactivos BD Multitest™ IMK (CD3/CD8/CD45/CD4 y CD3/CD16+CD56/CD45/CD19) en BD Trucount™ Tubes se evaluó estudiando lo siguiente:

- Cambios asociados al almacenamiento de la sangre completa antes de la tinción.
- Cambios producidos como resultado del tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de los datos.
- Efecto combinado de las dos situaciones.

Las muestras de sangre completa se analizaron en las 48 horas posteriores a la extracción y las muestras teñidas se analizaron en las 24 horas posteriores a la tinción. Todas las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (20–25 °C) antes de la tinción o la adquisición de datos.

En función de los resultados de este estudio, recomendamos realizar la tinción de las muestras en un plazo de 48 horas tras la extracción y analizarlas en un plazo de 24 horas tras la tinción.

Linealidad (citómetro de flujo BD FACSCanto™)

La linealidad de BD Multitest™ IMK Kit se evaluó para el sistema BD FACSCanto™ dentro de un intervalo de concentración de leucocitos de 0 a $3,0 \times 10^4$ leucocitos/ μ l. Se observó que los resultados eran lineales dentro de los intervalos siguientes.

Subpoblación	Intervalo (células/ μ l)
CD3	48–9627
CD4	29–5827
CD8	22–4076
CD19	5–1131
CD16+CD56	4–671

Citómetro de flujo BD FACSCalibur™

Comparación de métodos (citómetro de flujo BD FACSCalibur™)

El porcentaje y los recuentos absolutos de subpoblaciones de linfocitos obtenidos con los reactivos BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 y BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 en BD Trucount™ Tubes se compararon con los resultados de BD Tritest™ CD3/CD4/CD45, BD Tritest™ CD3/CD8/CD45, BD Tritest™ CD3/CD16+CD56/CD45 o BD Tritest™ CD3/CD19/CD45 en BD Trucount™ Tubes.

Se tomaron muestras de sangre completa aleatoriamente de donantes normales y con alteraciones en dos laboratorios clínicos y se evaluaron en ambos sistemas. Las estadísticas de regresión indican que los resultados son sustancialmente equivalentes. Consulte la Tabla 37 y la Tabla 38.

Tabla 37 Análisis de regresión para BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 (citómetro de flujo BD FACSCalibur™)

Subpoblación	N	Unidad	R	Pendiente	Intersección	Intervalo
CD3 ⁺ promedio	124	%	1,0	1,002	0,254	22–90
		células/ μ l	0,98	1,028	-20,451	189–2987
CD3 ⁺ CD4 ⁺	124	%	1,0	0,996	-0,434	1–62
		células/ μ l	0,98	1,015	-7,692	93–1904
CD3 ⁺ CD8 ⁺	124	%	1,0	1,018	-0,383	13–78
		células/ μ l	0,99	1,001	2,494	132–2229

Tabla 38 Análisis de regresión para BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 (citómetro de flujo BD FACSCalibur™)

Subpoblación	N	Unidad	R	Pendiente	Intersección	Intervalo
CD3 ⁺ promedio	126	%	0,99	0,99	1,74	21,5–90,0
		células/ μ l	0,98	1,01	-10,18	100–2883
CD3 ⁻ CD19 ⁺	126	%	0,99	0,98	-0,25	0–59
		células/ μ l	0,98	0,95	1,77	3–877,6
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	126	%	0,97	0,97	-0,85	3–40,0
		células/ μ l	0,96	0,92	-5,44	37–901

Reproducibilidad intramuestral (citómetro de flujo BD FACSCalibur™)

Se realizaron estimaciones de la reproducibilidad intramuestral en tres laboratorios clínicos a partir de cinco repeticiones de cada muestra, tomadas de donantes normales y anómalos. Las medias y DE o CV (o ambos) de los porcentajes y recuentos absolutos de las subpoblaciones superiores a 100 células/μl se presentan en la Tabla 39 y la Tabla 40 (BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4) y en la Tabla 41 y la Tabla 42 (BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19).

Tabla 39 Reproducibilidad intramuestral de porcentajes de subpoblaciones BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 (citómetro de flujo BD FACSCalibur™)

Subpoblación	N	Media (%)	DE
CD3 ⁺ promedio	46	72,0	1,06
CD3 ⁺ CD4 ⁺	46	26,1	0,85
CD3 ⁺ CD8 ⁺	46	42,0	0,93

Tabla 40 Reproducibilidad intramuestral de recuentos absolutos de BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 (citómetro de flujo BD FACSCalibur™)

Subpoblación	N	Media (células/μl)	%CV
CD3 ⁺ promedio	46	1219,9	6,34
CD3 ⁺ CD4 ⁺	38	565,2	7,02
CD3 ⁺ CD8 ⁺	46	687,8	6,79

Tabla 41 Reproducibilidad intramuestral de porcentajes de subpoblaciones BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 (citómetro de flujo BD FACSCalibur™)

Subpoblación	N	Media (%)	DE
CD3 ⁺ promedio	46	72,1	0,99
CD3 ⁻ CD19 ⁺	46	15,6	0,71
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	46	10,8	0,73

Tabla 42 Reproducibilidad intramuestral de recuentos absolutos de BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 (citómetro de flujo BD FACSCalibur™)

Subpoblación	N	Media (células/μl)	%CV
CD3 ⁺ promedio	46	1217	4,7
CD3 ⁻ CD19 ⁺	37	278	5,8
CD3 ⁻ (CD16+CD56) ⁺	33	217	8,3

Estabilidad (citómetro de flujo BD FACSCalibur™)

La estabilidad de los reactivos BD Multitest™ en BD Trucount™ Tubes se evaluó mediante el estudio de lo siguiente:

- Cambios asociados al almacenamiento de la sangre completa antes de la tinción.
- Cambios producidos como resultado del tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de los datos.
- Efecto combinado de las dos situaciones.

Las muestras de sangre completa se analizaron en las 48 horas posteriores a la extracción y las muestras teñidas se analizaron en las 24 horas posteriores a la tinción. Todas las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (20–25 °C) antes de la tinción o la adquisición de datos.

En función de los resultados de este estudio, recomendamos realizar la tinción de las muestras en un plazo de 48 horas tras la extracción y analizarlas en un plazo de 24 horas tras la tinción.

Linealidad (citómetro de flujo BD FACSCalibur™)

Se evaluó la linealidad de BD Multitest™ IMK Kit en una concentración de leucocitos de $0,2 \times 10^3$ a $29,7 \times 10^3$ leucocitos/ μ l y una concentración de linfocitos de $0,1 \times 10^3$ a $9,0 \times 10^3$ linfocitos/ μ l. Se observó que los resultados eran lineales dentro del intervalo CD3⁺, el intervalo CD3⁺CD4⁺, el intervalo CD3⁺CD8⁺, el intervalo CD3⁻CD16⁺CD56⁺ y el intervalo CD19⁺.

13. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible causa	Solución
La diferenciación entre residuos y células es escasa.	La muestra es de mala calidad.	Compruebe la viabilidad.
	La muestra es demasiado antigua.	Consiga una nueva muestra y téñala rápidamente.
La tinción es débil o está decayendo.	La concentración celular era excesiva en la etapa de tinción.	Compruebe la concentración celular y ajústela si es necesario.
	Las células teñidas se han almacenado demasiado tiempo antes de adquirirlas.	Repita la tinción con una muestra nueva y adquiérala rápidamente.
Se han registrado pocas células o no se ha registrado ninguna.	La concentración celular era demasiado baja.	Vuelva a poner en suspensión una muestra nueva a una concentración más alta. Repita la tinción y la adquisición.
	El citómetro no funciona correctamente.	Solucione los problemas del instrumento. Consulte las instrucciones de uso del citómetro para obtener más información.

GARANTÍA

A menos que se indique lo contrario en alguna de las condiciones generales de venta de BD para clientes fuera de los Estados Unidos, se aplica la garantía siguiente a la compra de estos productos.

SE GARANTIZA ÚNICAMENTE QUE LOS PRODUCTOS VENDIDOS SE AJUSTAN A LA CANTIDAD Y AL CONTENIDO INDICADOS EN LA ETIQUETA, O EN EL ETIQUETADO DEL PRODUCTO, EN EL MOMENTO DE SUMINISTRARLO AL COMPRADOR. POR EL PRESENTE, BD RENUNCIA A CUALQUIER OTRA GARANTÍA, EXPRESA O IMPLÍCITA, INCLUIDAS LAS GARANTÍAS DE COMERCIABILIDAD E IDONEIDAD PARA UN FIN DETERMINADO Y DE NO INFRACCIÓN. LA ÚNICA RESPONSABILIDAD DE BD QUEDA LIMITADA A LA SUSTITUCIÓN DE LOS PRODUCTOS O AL REEMBOLSO DEL PRECIO DE COMPRA. BD NO ES RESPONSABLE DE LOS DAÑOS A LA PROPIEDAD NI DE NINGÚN DAÑO ACCIDENTAL O DERIVADO, INCLUIDOS DAÑOS PERSONALES O PÉRDIDAS ECONÓMICAS, CAUSADOS POR EL PRODUCTO.

REFERENCIAS

- 1 Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut*. 1989;59:200-206.
- 2 Nicholson JKA. Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immunodeficiency diseases. *Arch Pathol Lab Med*. 1989;113:598-605.
- 3 Foucar K, Goeken JA. Clinical application of immunologic techniques to the diagnosis of lymphoproliferative and immunodeficiency disorders. *Lab Med*. 1982;13:403-413.
- 4 Cohen SB, Weetman AP. Activated interstitial and intraepithelial thyroid lymphocytes in autoimmune thyroid disease. *Acta Endocrinol (Copenh.)*. 1988;119:161-166.
- 5 Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: Correlation with clinical features. *Am J Med*. 1982;72:783-790.
- 6 Giorgi JV, Hultin LE. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10:55-61.
- 7 Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS*. 1990;4:479-497.
- 8 Centers for Disease Control. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR*. 2003;52(RR02):1-13.
- 9 Nicholson JKA, Jones BM, Hubbard M. CD4 T-lymphocyte determinations on whole blood specimens using a single-tube three-color assay. *Cytometry*. 1993;14:685-689.

- 10 Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Three-color supplement to the NIAID DAIDS guideline for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry*. 1996;26:227-230.
- 11 Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry*. 1996;26:16-21.
- 12 Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Defective suppressor cell function mediated by T8+ cell lines from patients with progressive multiple sclerosis. *J Immunol*. 1986;137:3436-3439.
- 13 Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T, et al. A definition of natural killer cells. In: Ades EW, Lopez C, eds. *Natural Killer Cells and Host Defense*. Basel: Karger; 1989:1.
- 14 Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136:4480-4486.
- 15 Haynes BF. Summary of T cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
- 16 Kan EA, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti-Leu-4 antibody. *J Immunol*. 1983;131:536-539.
- 17 Knowles RW. Immunochemical analysis of the T cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:259-288.
- 18 Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories: T2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leucocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:25-60.
- 19 Evans VJ, Glasser L. Accuracy of low electronic platelet counts using platelet distribution curves. *Am J Med Tech*. 1981;47:15-18.
- 20 Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, ed. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
- 21 Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Anti-Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol*. 1983;131:212-216.
- 22 Perussia B, Acuto O, Terhorst C, et al. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J Immunol*. 1983;130:2142-2148.

- 23 Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J Immunol.* 1983;130:2133-2141.
- 24 Schmidt RE. Non-lineage/natural killer section report: new and previously defined clusters. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:517-574.
- 25 Ritz J, Trinchieri G, Lanier LL. NK-cell antigens: section report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens.* Vol 2. New York, NY: Oxford University Press; 1995:1367-1372.
- 26 Nadler LM. B cell/leukemia panel workshop: summary and comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leucocyte Typing II: Human B Lymphocytes.* Vol 2. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-43.
- 27 van Dongen JJ, Krissansen GW, Wolvers-Tettero IL, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood.* 1988;71:603-612.
- 28 Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath.* 1991;60:190-208.
- 29 Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leucocyte Typing.* New York, NY: Springer-Verlag; 1984:9-142.
- 30 Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med.* 1981;153:310-323.
- 31 Engleman EG, Benike CJ, Glickman E, Evans RL. Antibodies to membrane structures that distinguish suppressor/cytotoxic and helper T lymphocyte subpopulations block the mixed leukocyte reaction in man. *J Exp Med.* 1981;154:193-198.
- 32 Kotzin BL, Benike CJ, Engleman EG. Induction of immunoglobulin-secreting cells in the allogeneic mixed leukocyte reaction: regulation by helper and suppressor lymphocyte subsets in man. *J Immunol.* 1981;127:931-935.
- 33 Moebius U. Cluster report: CD8. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
- 34 Terry LA, DiSanto JP, Small TN, Flomenberg N. Differential expression of the CD8 and Lyt-3 antigens on a subset of human T-cell receptor γ/δ -bearing lymphocytes. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:345-346.

- 35 Engleman EG, Benike CJ, Evans RL. Circulating antigen-specific suppressor T cells in a healthy woman: mechanism of action and isolation with a monoclonal antibody. *Clin Res*. 1981;29:365A.
- 36 Ledbetter JA, Frankel AE, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Human Leu T-cell differentiation antigens: quantitative expression on normal lymphoid cells and cell lines. In: Hämmerling G, Hämmerling U, Kearney J, eds. *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas: Perspectives and Technical Advances*. New York, NY: Elsevier/North Holland; 1981:16-22.
- 37 Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol*. 1983;131:1789-1796.
- 38 Perussia B, Trinchieri G, Jackson A, et al. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1984;133:180-189.
- 39 Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol*. 1991;146:4421-4426.
- 40 Schubert J, Lanier LL, Schmidt RE. Cluster report: CD56. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.
- 41 Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*. 1987;236:799-806.
- 42 Moldenhauer G, Dörken B, Schwartz R, Pezzutto A, Knops J, Hammerling GJ. Analysis of ten B lymphocyte-specific workshop monoclonal antibodies. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. Vol 2. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:61-67.
- 43 Tedder TF, Zhou LJ, Engel P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today*. 1994;15:437-442.
- 44 Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD19. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:34-36.
- 45 Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B-lymphocyte development. *Blood*. 1987;70:1316-1324.
- 46 Schwinzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
- 47 Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10:43-55.

- 48 *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
- 49 Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html>. Accessed February 09, 2021.
- 50 *Collection of Diagnostic Venous Blood Specimens; Approved Standard—Seventh Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. CLSI document GP41-Ed7.
- 51 Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
- 52 Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
- 53 College of American Pathologists. Flow Cytometry Checklist. https://webapps.cap.org/apps/docs/laboratory_accreditation/checklists/flow_cytometry_sep07.pdf. Accessed February 2021.
- 54 Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol*. 1985;3:33-37.
- 55 Angadi CV. Lack of Leu-3a epitope on T-helper (CD4) lymphocytes. *J Clin Lab Anal*. 1990;4:193-195.
- 56 *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010. CLSI document EP09-Ed3c.
- 57 Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1993;160:215-218.
- 58 *Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples*. 3rd Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. CLSI document EP09-Ed3c.
- 59 *Evaluation of Precision of Quantitative Measurements Procedures; Approved Guideline—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document EP05-A3.
- 60 Valiathan R, Deeb K, Diamante M, Ashman M, Sachdeva N, Asthana D. Reference ranges of lymphocyte subsets in healthy adults and adolescents with special mention of T cell maturation subsets in adults of South Florida. *Immunobiology*. 2014;219:487-496.
- 61 Tembe N, Joaquim O, Alfai E, et al. Reference values for clinical laboratory parameters in young adults in Maputo, Mozambique. *PLoS ONE*. 2014;9:e97391.

-
- 62 Das Gupta A, Ochani Z. Single platform enumeration of lymphocyte subsets in healthy Indians aged between 18 and 49 years. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70:361-362.
- 63 Centers for Disease Control. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. *MMWR.* 2003;52:1-13.

MARCAS COMERCIALES

BD, el logotipo de BD, Calibrite, CellQuest, FACS, FACSCalibur, FACSCanto, FACSComp, FACSDuet, FACSFlow, FACSLytic, FACSuite, Multiset, Multitest, Tritest, Trucount y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company o sus filiales. Todas las marcas comerciales son propiedad de sus respectivos dueños.
© 2021 BD. Todos los derechos reservados.

INFORMACIÓN DE CONTACTO



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com



eifu.bd.com

Sitio web del glosario de símbolos:
bd.com/symbols-glossary

BD Multitest™
CD3/CD8/ CD45/CD4

50 ensayos por kit —Número de catálogo 340499

50 ensayos por kit con los tubos BD Trucount™ —Número de
catálogo 340491

**DISPOSITIVOS
PARA
DIAGNÓSTICO
IN VITRO
(IVD)**

**Solo con
indicación
profesional**

© 2017 BD. La marca BD, el logotipo de BD y todas
las otras marcas registradas pertenecen a Becton,
Dickinson and Company.



8/2017

23-3600-06



Becton, Dickinson and
Company

BD Biosciences

2350 Qume Drive

San Jose, CA EE.UU.

95131 EE.UU.

bdbiosciences.com

ClinicalApplications@bd.com



Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

Contenido

1. USO PREVISTO	4
2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN	4
3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO.....	5
4. REACTIVO.....	6
Composición del reactivo	6
Reactividad cruzada	7
Precauciones	7
Conservación y manipulación.....	8
5. INSTRUMENTOS	8
6. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	10
Condiciones de interferencia	10
7. REACTIVOS Y MATERIALES	11
Reactivo suministrado.....	11
Reactivos y materiales requeridos pero que no se suministran	11
8. INSTRUCCIONES DE USO	13
Dilución de la solución lisante BD FACS	13
Técnica de pipeteo inverso	13
Control de calidad	13
Para realizar el control de calidad:.....	13
Tinción de las células.....	14
Adquisición de las muestras.....	15
9. RESULTADOS.....	15
Cálculo de los recuentos absolutos	16
Datos representativos	16
10. LIMITACIONES	19
11. VALORES PREVISTOS	19
Citómetro de flujo BD FACSLytic	20
Citómetros de flujo FACSCanto II, BD FACSCanto y BD FACSCalibur	20
12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO.....	20
Citómetro de flujo BD FACSLytic	20

340499 IU ESP - 3

Citómetro de flujo BD FACSCanto II	27
Citómetro de flujo BD FACSCanto	31
Citómetro de flujo BD FACSCalibur	34
13. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS	36
GARANTÍA.....	36
REFERENCIAS	37


Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

1. USO PREVISTO

El reactivo BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 con los tubos optativos BD Trucount™ está diseñado para uso con los citómetros de flujo BD FACSLyric™, BD FACSCanto™ II, BD FACSCanto™ y BD FACSCalibur™ para obtener recuentos absolutos de las siguientes poblaciones de linfocitos humanos maduros en sangre entera periférica para inmunofenotipificación:

- Linfocitos T (CD3+)
- Linfocitos T colaboradores (CD3+CD4+)
- Linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3+CD8+)

Se indica el uso de este reactivo en la evaluación inmunológica de individuos normales y en pacientes que presentan, en forma efectiva o presunta, deficiencia del sistema inmune.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los linfocitos humanos se pueden dividir en tres poblaciones importantes de acuerdo con su función biológica y la expresión del antígeno en la superficie celular:

linfocitos T, linfocitos B y natural killer o NK.

Los linfocitos T supresores/citotóxicos son una subpoblación de linfocitos T (CD3+) que son CD8+. Los linfocitos T colaboradores son una subpoblación de los linfocitos T (CD3+) que son CD4+. Los porcentajes o recuentos de CD3+CD8+ y CD3+CD4+ se utilizan para caracterizar y monitorear algunas formas de inmunodeficiencia¹⁻³ y de enfermedades autoinmunes.^{4,5}

Obtener porcentajes o recuentos de linfocitos T colaboradores puede ser útil para controlar a individuos con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).⁶ Las personas con VIH en general presentan una disminución continua en los recuentos de linfocitos T colaboradores a medida que avanza la infección.⁷

El porcentaje de linfocitos T se encuentra fuera del rango normal de referencia en algunas enfermedades autoinmunes.⁸ El porcentaje

relativo de la población CD8+ es elevado en muchos pacientes con deficiencias inmunes congénitas o adquiridas, como la inmunodeficiencia combinada grave (SCID, por su sigla en inglés)¹ o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).⁶

Los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) recomiendan el uso de combinaciones de reactivos con anticuerpos anti-CD3 para calcular el porcentaje de poblaciones de linfocitos T en individuos infectados con VIH.⁹ BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 permite identificar los linfocitos T colaboradores y obtener el recuento sin interferencia de los monocitos CD3–CD4+ contaminados.^{10–12}

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se agrega sangre entera al reactivo, los anticuerpos conjugados con el fluorocromo en el reactivo se unen específicamente a los antígenos de superficie del leucocito. Durante la adquisición, las células son impactadas por el haz de láser y la luz del láser se dispersa. Las células tincionadas producen fluorescencia. La dispersión y las señales de fluorescencia que detecta el instrumento brindan información sobre el tamaño de la célula, la complejidad interna y la intensidad relativa de la fluorescencia. Los reactivos de BD Multitest emplean la estimulación por fluorescencia, lo que permite el gating (separación) por fluorescencia directa de la población de linfocitos^{10 -12} para reducir la contaminación de los glóbulos rojos no lisados o nucleados en el gating.

Cuando se utilizan los tubos BD Trucount, se tinciona un volumen predeterminado de la muestra directamente en un tubo BD Trucount. El pellet liofilizado del tubo se disuelve y se libera una cantidad determinada de microesferas fluorescentes. Durante el análisis, se puede determinar la cantidad absoluta (células/ μ L) de células separadas en la muestra comparando los eventos celulares con los eventos con microesferas. Si se utiliza un software de BD adecuado, específico para el citómetro (consultar la Tabla 1, sección de Instrumentos), los recuentos absolutos se realizan con el software.

Si el análisis de los datos se realiza en forma manual con software como BD CellQuest™ Pro, divida simplemente la cantidad de eventos celulares positivos por la cantidad de eventos con microesferas y luego multiplique por la cantidad de microesferas BD Trucount™ por pellet dividida por el volumen de la muestra en μL .

4. REACTIVO

Composición del reactivo

BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 contiene CD3 conjugado con FITC, clon SK7;¹³⁻¹⁵ CD8 conjugado con PE, clon SK1;^{16,17} CD45 conjugado con PerCP, clon 2D1 (HLe-1);¹⁸ y CD4 conjugado con APC, clon SK3.^{16,17,19}

CD 3 identifica los linfocitos T y reconoce la cadena épsilon del complejo (TCR) del antígeno anti-CD3/receptor del antígeno de las células T.²⁰ Este complejo está compuesto por al menos 6 proteínas cuyo peso molecular oscila entre 20 y 30 kilodaltones (kDa).²¹ El antígeno reconocido con los anticuerpos anti-CD3 se asocia de manera no covalente con TCR α/β o γ/δ (70 a 90 kDa).²²

CD8 identifica a los linfocitos T supresores/citotóxicos y reconoce a la subunidad α de 32-kDa de un complejo bimolecular con un puente de disulfuro.²³ El dominio citoplasmático de la subunidad del antígeno anti-CD8 está asociado con la proteína tirosina quinasa p56lck.²⁴ La molécula de CD8 interactúa con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por su sigla en inglés) clase I, que aumenta la adhesión entre los linfocitos T CD8+ y las células diana.²⁵⁻²⁷ La unión de la molécula de CD8 a las moléculas MHC clase I refuerza la activación de los linfocitos T inactivados.²⁵⁻²⁷

CD45 identifica leucocitos y reconoce el antígeno de los leucocitos humanos de 180- a 220-kDa que forma parte de la familia de antígenos comunes de leucocitos (LCA, por su sigla en inglés).²⁸

CD4 identifica a los linfocitos T colaboradores y reconoce al antígeno anti-CD4, con un peso molecular de 59 kDa,²⁹ que interactúa con las moléculas MHC clase II y es el receptor primario para el VIH.^{30,31} La

porción citoplasmática del antígeno se asocia con la proteína tirosina quinasa p56lck.²⁴

Los anticuerpos anti-CD3, anti-CD8 y anti-CD4 están compuestos de cadenas pesadas de IgG de ratón₁ y cadenas livianas kappa.

Los valores de concentración de los anticuerpos conjugados se muestran en la siguiente tabla:

Concentración del reactivo (µg/mL)	
CD3 FITC	2,3
CD8 PE	1,75
CD45 PerCP	7,50
CD4 APC	0,92

Reactividad cruzada

El anticuerpo anti-CD8 reacciona con los linfocitos NK⁴² y con los linfocitos T supresores/citotóxicos. El anticuerpo anti-CD4 reacciona con los monocitos y con los linfocitos T colaboradores.¹⁹

Precauciones

- No use el reactivo si observa algún cambio en el aspecto. La precipitación o la descoloración son indicio de inestabilidad o deterioro.
- El reactivo del anticuerpo contiene ázida de sodio como conservante. Sin embargo, trate de evitar la contaminación microbiana ya que puede arrojar resultados erróneos.
- Si usa los tubos BD Trucount, calibre las pipetas para que descarguen exactamente 50 µL de muestra. Recomendamos utilizar la técnica de pipeteo inverso de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la pipeta.
- El recuento de microesferas varía por lote de los tubos BD Trucount. Es muy importante usar el recuento de microesferas del lote de los tubos BD Trucount que está en uso cuando se ingresa este valor en el software, o cuando se calcula un recuento absoluto de forma manual. No mezcle lotes de distintos tubos en la misma corrida.

- Los tubos BD Trucount están diseñados para uso con un procedimiento específico de lisado/no lavado. No intente fijar un umbral en la dispersión frontal (FSC, por su sigla en inglés) para la recopilación de datos.

ADVERTENCIA Todas las muestras y los materiales biológicos con los que entra en contacto se consideran peligros biológicos. Manipular como si existiera la posibilidad de transmisión de infecciones^{32,33} y eliminar con las precauciones adecuadas de acuerdo con las normas federales, estatales y locales. Nunca cargue la pipeta con la boca. Use indumentaria, gafas y guantes de protección adecuados. Se informó que la fijación desactiva el VIH.⁴³

Conservación y manipulación

- Conservar el reactivo a una temperatura de 2°C–8°C. No use luego de la fecha de caducidad que figura en el rótulo.
- No congele el reactivo ni lo exponga a la luz directa durante la conservación o la incubación con células. Mantenga el frasco del reactivo seco.
- Conservar los tubos BD Trucount en la bolsa original de papel metalizado a una temperatura de 2°C–25°C. Para evitar la condensación, abrir la bolsa solo luego de alcanzar la temperatura ambiente y volver a sellarla luego de retirar el tubo. Examine el disecante cada vez que abre la bolsa. Si el color del disecante cambió de azul a lavanda, descarte el resto de los tubos. Usar los tubos dentro del plazo de 1 hora después de retirarlos del envase. Una vez que el envase está abierto, los tubos conservan la estabilidad durante 1 mes. No usar pasada la fecha de caducidad del rótulo.

5. INSTRUMENTOS

BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 y los tubos BD Trucount están diseñados para uso en un citómetro de flujo equipado con el hardware y el software de computación adecuados. BD desarrolló un software específico para el citómetro de flujo que puede seleccionar los voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT, por su sigla en inglés) y la compensación de la fluorescencia, verificar la sensibilidad y el

desempeño del instrumento o realizar el control diario de calidad. BD también desarrolló un software que calcula automáticamente los recuentos absolutos con los tubos BD Trucount. Sin embargo, se pueden utilizar paquetes de software de otros fabricantes que no sean BD para la adquisición y el análisis de datos; los recuentos absolutos se pueden calcular manualmente. Recomendamos los sistemas BD de la Tabla 1 para realizar la calibración del citómetro, la adquisición y el análisis. Consultar las instrucciones de uso (IU) del reactivo, el citómetro o el software para conocer más detalles.

Los resultados se pueden alcanzar con otras plataformas. El citómetro de flujo debe estar equipado con equipos láser de 635 nm y de 488 nm y debe poder detectar la dispersión de la luz (frontal y lateral) y la fluorescencia de cuatro colores con una emisión que se pueda detectar en cuatro rangos:

- 515–545 nm
- 562–607 nm
- >650 nm
- 652–668 nm

El citómetro de flujo debe poder generar un umbral o discriminar con el canal >650-nm. Los usuarios de citómetros de flujo fabricados por otras empresas que no sean BD deben consultar las instrucciones del fabricante para calibrar la inmunofenotipificación con cuatro colores.

Con este producto se pueden utilizar los cargadores BD FACST[™] Loader y BD FACST[™] Universal Loader.

Asegúrese de que el instrumento esté bien calibrado y realice controles diarios de calidad antes de usarlo.

Tabla 1 Sistemas BD recomendados

Citómetro de flujo	Microesferas de calibración	Software de calibración	Software de análisis
BD FACSLyric [™]	Microesferas CS&T de BD [™] Kit de microesferas de 7 colores BD [™] para citometría	Software clínico BD FACSuite [™]	Software clínico BD FACSuite

Citómetro de flujo	Microesferas de calibración	Software de calibración	Software de análisis
	de flujo		
BD FACSCanto™ BD FACSCanto™ II	Microesferas de calibración de 7 colores BD FACST™	Software clínico BD FACSCanto™	Software clínico BD FACSCanto™
BD FACSCalibur™	Microesferas de 3 colores BD Calibrite™ Microesferas APC BD Calibrite™	Software BD FACSCComp™ v4.0 o posterior	Software BD Multitest™

6. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recolecte la sangre de manera aséptica por venopunción^{34,35} en un tubo para recolección de sangre BD Vacutainer® EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) o equivalente. El reactivo BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 y los tubos BD Trucount se validaron con fórmulas líquidas y deshidratadas de EDTA.

Para este procedimiento se necesita como mínimo 100 µL de sangre entera. Siga las pautas del fabricante del tubo de recolección para el volumen mínimo de sangre que se recolectará para garantizar la dilución adecuada de la muestra, en especial cuando se realizan los recuentos absolutos con las microesferas BD Trucount. Obtenga un recuento de glóbulos blancos y un recuento diferencial de glóbulos blancos con la misma muestra de sangre entera, antes de la tinción, para garantizar que el recuento de glóbulos blancos esté dentro del rango lineal para el instrumento correspondiente, o calcule los recuentos absolutos a partir de los porcentajes.

La sangre anticoagulada conservada a temperatura ambiente (20°C–25°C) se debe tincionar dentro de las 48 horas de la extracción; se debe analizar dentro de las 24 horas posteriores a la tinción.

Condiciones de interferencia

No use muestras del paciente previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre entera refrigeradas antes de la tinción pueden

arrojar resultados anormales. Las muestras de pacientes inmunodeprimidos pueden alcanzar una resolución de baja calidad³⁶ Los blastocitos pueden interferir con los resultados de los ensayos. Las muestras hemolizadas se deben rechazar.

7. REACTIVOS Y MATERIALES

Reactivo suministrado

El reactivo, suficiente para 50 ensayos cuando se usa según las indicaciones, se entrega en 1 mL de solución salina tamponada con ázida sódica (0,1%).

- BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 (Número de catálogo 340499), o
- BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 con tubos BD Trucount (Número de catálogo 340491)

Los tubos BD Trucount contienen un pellet congelado en seco de microesferas fluorescentes en un tubo de uso único. Cada bolsa BD Trucount contiene 25 tubos, suficientes para 25 ensayos. El kit se entrega con dos bolsas de tubos BD Trucount.

Reactivos y materiales requeridos pero que no se suministran

- Para citómetros de flujo BD FACSLyric:
Microesferas CS&T de BD (Números de catálogo 662413, 662414)
Kit de microesferas de calibración para citometría de flujo BD Calibrite™ de 7 colores (Número de catálogo 662961)
- Para los citómetros de flujo BD FACSCanto y BD FACSCanto II:
Para las microesferas de calibración BD FACS de 7 colores (Número de catálogo 335775)
- Para citómetros de flujo BD FACSCalibur:
Kit de 3 colores BD Calibrite y microesferas APC BD Calibrite (Números de catálogo. 340486 y 340487, respectivamente)
- Solución lisante BD FACS™(Número de catálogo 349202)
Consultar las IU de la *solución lisante FACS™* para conocer las instrucciones y las advertencias.

- Agua de grado reactivo (destilada o desmineralizada)
- Líquido envolvente BD FACSTFlow™ (número de catálogo 342003) o equivalente

CUIDADO Use solo el líquido envolvente BD FACSTFlow para diluir las microesferas de 3 colores BD Calibrite, las microesferas APC BD Calibrite y las microesferas CS&T de BD.

NOTA Use la solución tamponada para dilución de las microesferas BD™ para citometría de flujo, para reconstituir las microesferas.

- Tubos para recolección de sangre BD Vacutainer EDTA o equivalentes
- Tubos descartables para ensayos Falcon®* de polistireno con tapa, 12 x 75 mm o equivalentes (en caso de que no se utilicen los tubos BD Trucount)
- Agitador vorticial
- Micropipeteador con puntas
- Dispensador a granel o pipeta (450 µL) para administrar solución lisante 1X BD FACS
- Control del proceso de lisado de la sangre entera, por ejemplo
 - Control BD™ Multi-Check (Números de catálogo 349700, 349701, 349702)
 - Control basal de CD4 BD™ Multi-Check (números de catálogo 349703, 349704, 349705)

NOTA Recomendamos correr los controles de BD Trucount™ (Número de catálogo 340335) para verificar la técnica de pipeteo. Los controles son compatibles con el sistema BD FACSCalibur. No usar los controles BD Trucount con el software clínico BD FACSCanto. Las microesferas de control BD Trucount pueden interferir con los resultados de los recuentos absolutos.

* Falcon es marca registrada de Corning Incorporated.

8. INSTRUCCIONES DE USO

Dilución de la solución lisante BD FACS

Diluir el concentrado 10 X 1:10 con agua desmineralizada a temperatura ambiente (20°C–25°C). La solución preparada es estable durante 1 mes cuando se conserva en un recipiente de vidrio o de polietileno de alta densidad (HDPE, por su sigla en inglés) a temperatura ambiente.

Técnica de pipeteo inverso

Es fundamental ser exacto en el manejo de la pipeta cuando se usa un tubo BD Trucount. Recomendamos la técnica de pipeteo inverso para colocar la muestra en un tubo BD Trucount. Para el pipeteo inverso, presione el botón hasta el segundo tope. Suelte el botón para que el exceso de muestra vaya a la punta. Presione el botón hasta el primer tope para descargar el volumen exacto de muestra; el exceso queda en la punta.

Control de calidad

De acuerdo con las pautas del Instituto Estadounidense de Patólogos (*College of American Pathologists*, CAP, por su sigla en inglés), recomendamos correr dos niveles de control líquido (control del proceso). Los controles se deben correr al menos una vez el día en que se realizan los ensayos de los pacientes.³⁸

Use controles comerciales con valores establecidos para porcentajes positivos y recuentos absolutos en cada corrida para evaluar el desempeño del sistema. BD ofrece el control BD Multi-Check y el control basal de CD4 BD Multi-Check para controlar los procesos.

Para realizar el control de calidad:

1. Mezclar bien el control BD Multi-Check correspondiente o el proceso de control equivalente.

Consulte las IU para conocer las instrucciones detalladas.

2. Tincionar la muestra de control con BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 según se describe en la sección siguiente.

La muestra de control se debe procesar como las muestras de los pacientes para controlar el desempeño constante de todo el proceso analítico.

3. Adquirir la muestra de control tincionada en el citómetro de flujo.
4. Inspeccione visualmente CD45 en el gráfico de puntos SSC.

La población de linfocitos debe aparecer como un grupo compacto y brillante con una SSC baja. Los monocitos y los granulocitos deben también aparecer como grupos o clústeres separados. No avance con el análisis si las poblaciones son difusas o si la separación entre clústeres es poca o inexistente.

5. Verifique que los resultados se encuentren dentro de los valores informados en la planilla de Valores del ensayo.

Tinción de las células

Proteja los tubos de la luz directa. Realice el procedimiento a temperatura ambiente. Consulte las Precauciones y las condiciones de interferencia.

1. Rotule los tubos de 12 x 75 mm con la muestra de cada paciente con el número de identificación de la muestra.

Para los recuentos absolutos, rotule un tubo BD Trucount en lugar del tubo de 12 x 75mm.

NOTA Antes de usar, verifique que el pellet de la microesfera BD Trucount esté intacto y dentro del retenedor de metal en el fondo del tubo. De lo contrario, descarte el tubo BD Trucount y reemplácelo por otro.

2. Cargar con la pipeta 20 μ L de BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en el fondo del tubo.

Si usa un tubo BD Trucount, descargue el reactivo con la pipeta en la pared del tubo, justo por encima del retenedor de metal, sin tocar el pellet de la microesfera.

3. Colocar con la pipeta 50 μ L de sangre entera anticoagulada bien mezclada en el fondo del tubo.

NOTA Si usa un tubo BD Trucount, recomendamos usar la técnica de pipeteo inverso para colocar la muestra en la pared del tubo justo por encima del retenedor. Evite manchar con sangre la pared del tubo. Si la sangre entera permanece en la pared del tubo, no se tincionará con el reactivo y esto puede afectar los resultados.

4. Tapar el tubo y agitar con cuidado para mezclar.
5. Incubar durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20°C–25°C).
6. Agregar 450 µL de solución lisante BD FACS 1X al tubo.
7. Tapar el tubo y agitar con cuidado para mezclar.
8. Incubar durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20°C–25°C).

La muestra está lista para el análisis en el citómetro de flujo. Si las muestras no se analizan de inmediato luego de la tinción, consérvelas lejos de la luz a temperatura ambiente (20°C–25°C).

Adquisición de las muestras

1. Agitar bien las células a baja velocidad.

Es importante reducir la aglutinación antes de correr las muestras en el citómetro de flujo.³⁷

NOTA Si usa un cargador (Loader), agite los tubos inmediatamente antes de colocarlos en las gradillas del cargador.

2. Colocar el tubo en el citómetro y realizar la adquisición de la muestra.
3. Antes de la adquisición de las muestras, ajustar el umbral para reducir al mínimo los restos celulares y garantizar que queden incluidas las poblaciones de interés.
4. Analizar los datos con el software específico del citómetro. Consultar las IU del citómetro para obtener más información.

9. RESULTADOS

Los resultados se informan como el porcentaje de células positivas por población de linfocitos o la cantidad de células positivas por microlitro de sangre (recuento absoluto).

Cálculo de los recuentos absolutos

Durante el análisis, la cantidad absoluta (células/ μ L) de células positivas en la muestra se puede determinar comparando los eventos con células con los eventos con microesferas.

Si se utilizan los paquetes de software BD FACSuite Clinical, BD FACSCanto Clinical o BD Multiset, el software obtendrá los recuentos absolutos.

Para analizar los datos en forma manual, use el software BD CellQuest™ Pro u otro. El recuento absoluto de la población de células (A) se puede calcular con la siguiente ecuación:

$A = X/Y \times N/V$, donde:

X es la cantidad de eventos celulares positivos

Y es la cantidad de eventos con microesferas

N es la cantidad de microesferas por ensayo, que se encuentra en el envase de los tubos BD Trucount y puede variar entre lotes

V es el volumen de la muestra (50 μ L)

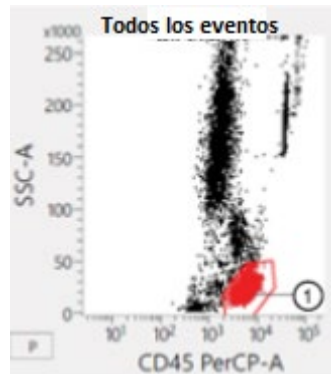
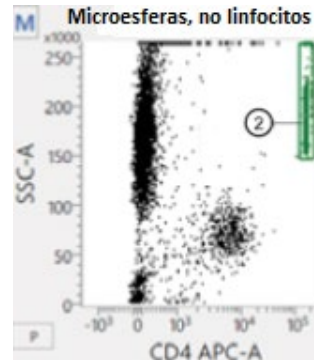
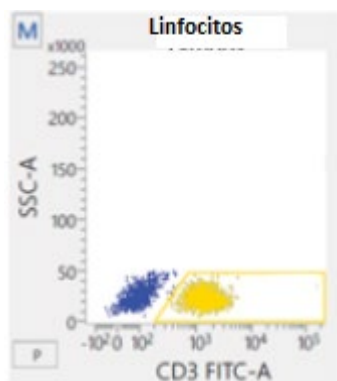
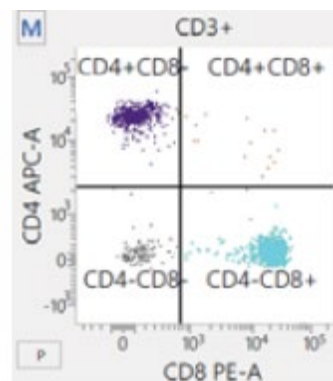
Datos representativos

Citómetro de flujo BD FACSLytic

Se adquirió una muestra de un individuo adulto, hematológicamente normal, tincionada con BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en un tubo BD Trucount con el software clínico BD FACSuite en el citómetro de flujo BD FACSLytic. Consulte la Figura 1. El panel A muestra los linfocitos CD45+ (1) identificados en CD45 PerCP-A en el gráfico de puntos de SSC-A. El panel B muestra los eventos de microesferas en los recuentos absolutos en los tubos BD Trucount (2) en CD4 APC-A en el gráfico de puntos SSC-A.

El panel C muestra los linfocitos T CD3+ en CD3 FITC-A en el gráfico de puntos SSC-A. El panel D muestra los linfocitos T supresores/citotóxicos (CD4-CD8+) y los colaboradores (CD4+CD8-) T en CD8 PE-A en el gráfico de puntos CD4 APC-A.

Figura 1 Datos representativos de una muestra de un individuo adulto, hematológicamente normal, tincionada con BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en un tubo BD Trucount (BD FACSLyric)

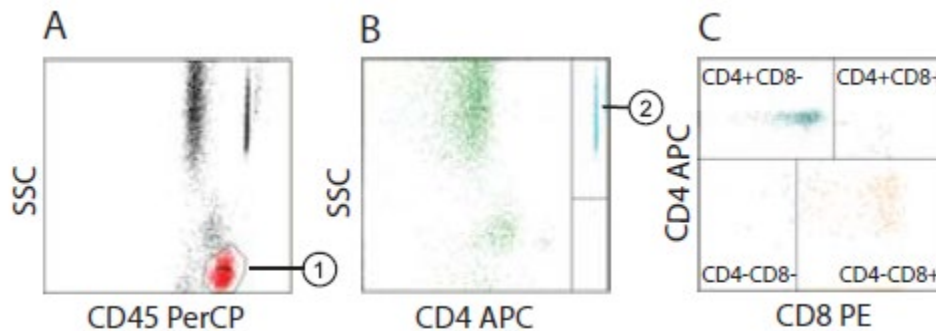
A**B****C****D**

Citómetro de flujo BD FACSCanto II

Se adquirió una muestra de un individuo adulto, hematológicamente normal, tincionada con BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en un tubo BD Trucount con el citómetro de flujo BD FACS FACSCanto II. Consultar la Figura 2. El panel A muestra los linfocitos CD45+ (1) identificados en CD45 PerCP en gráfico de puntos de SSC. El panel B muestra los eventos de microesferas para recuento absoluto en los tubos BD Trucount (2) en CD4 APC en el gráfico de puntos de SSC. El panel C muestra los linfocitos T supresores/citotóxicos (CD4-CD8+) y los

colaboradores (CD4+CD8-) T en CD8 PE en el gráfico de puntos de CD4 APC.

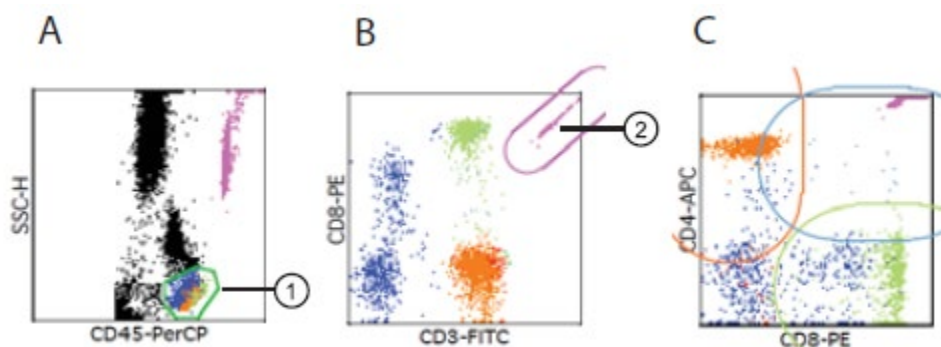
Figura 2 Muestra representativa de un individuo adulto, hematológicamente normal, tincionada con BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en un tubo BD Trucount (BD FACSCanto II)



Citómetro de flujo BD FACSCalibur

Se adquirió una muestra de un individuo adulto, hematológicamente normal, tincionada con BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en un tubo BD Trucount con un citómetro BD FACSCalibur. Consultar la Figura 3. El panel A muestra los linfocitos CD45+ (1) identificados en CD45 PerCP en el gráfico de puntos de SSC. El panel B muestra los eventos de microesferas de recuento absoluto en los tubos BD Trucount (2) en CD3 FITC en el gráfico de puntos de CD8 PE. El panel C muestra los linfocitos T supresores/citotóxicos (CD4-CD8+) y los colaboradores (CD4+CD8-) T en CD8 PE en el gráfico de puntos de CD4 APC.

Figura 3 Muestra representativa de un individuo adulto, hematológicamente normal, tincionada con BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en un tubo BD Trucount (BD FACSCalibur)



10. LIMITACIONES

- Los laboratorios deben establecer sus propios intervalos normales de referencia para los parámetros de BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 que pueden ser afectados por el sexo y la edad del paciente y la técnica de preparación. El origen racial del paciente³⁹ y las variaciones individuales en la expresión del epitopo⁴⁰ también pueden tener incidencia, si bien no existen suficientes datos para determinarla. Es necesario conocer la edad, el sexo, las características clínicas y el origen racial de los pacientes cuando se establece un intervalo de referencia determinado.⁴¹ Los intervalos de referencia se suministran solo con fines informativos.
- No se validó el uso de BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 con los anticoagulantes de heparina líquida o solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD) para obtener los recuentos absolutos con los tubos BD Trucount.
- El reactivo BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 no está diseñado para evaluar muestras para la detección de células leucémicas para uso en la fenotipificación de muestras de pacientes con leucemia.
- Los recuentos absolutos no se pueden comparar entre laboratorios que usan equipos de fabricantes distintos.

11. VALORES PREVISTOS

Se establecieron los intervalos de referencia para BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 con y sin los tubos BD Trucount.⁴¹ Para establecer los intervalos de referencia para el citómetro de flujo BD FACSLyric, se incluyeron en el estudio individuos adultos, hematológicamente normales, de entre 19 y más de 80 años de edad. Los estudios para otros instrumentos se realizaron en distintos momentos con muestras de distintas poblaciones, lo que puede contribuir a las diferencias en los intervalos de referencia entre los instrumentos.

Consulte la primera limitación en la sección anterior para obtener más información sobre los intervalos de referencia.

Citómetro de flujo BD FACSLyric**Tabla 2** Intervalos de referencia representativos para BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4

Población de linfocitos	N ^a	Unidades	Media	Rango del 95%
CD3+	130	%	72,00	56,65– 83,36
		células/μL	1551,28	840– 2.641
CD3+CD4+	130	%	46,51	32,42– 63,19
		células/μL	1003,50	488– 1.711
CD3+CD8+	130	%	23,25	8,99– 38,99
		células/μL	514,19	154– 1.097

a. N = cantidad de muestras

† Las edades de los individuos oscilaron entre los 18 y los 65 años de edad en los estudios para establecer los intervalos de referencia para los citómetros de flujo BD FACSCanto II, BD FACSCanto y BD FACSCalibur.

Citómetros de flujo FACSCanto II, BD FACSCanto y BD FACSCalibur**Tabla 3** Intervalos de referencia representativos para BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4

Población de linfocitos	N ^a	Unidades	Media	Rango del 95%
CD3+	164	%	72,00	56-86
		células/μL	1513	773– 2.737
CD3+CD4+	164	%	45	33-58
		células/μL	941	404– 1.612
CD3+CD8+	164	%	24	13-39
		células/μL	511	220– 1.129

12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO**Citómetro de flujo BD FACSLyric**

Método de comparación (Citómetro de flujo BD FACSLyric)

Los porcentajes para las poblaciones de linfocitos y los recuentos absolutos se calcularon con el reactivo BD Multitest CD3/ CD8/ CD45/CD4 en los tubos BD Trucount y se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSLytic con el software clínico BD FACSuite versión 1.0. Los resultados se compararon con resultados de reactivos analizados con el citómetro de flujo BD FACSCanto y el software clínico BD FACSCanto, versión 2.4 o posterior.

Las muestras de sangre entera se recolectaron en forma aleatoria en cinco centros de estudios clínicos. Se informan las estadísticas de comparación de los métodos para todos los subgrupos celulares.⁴⁴ Consultar la Tabla 4.

Tabla 4 Método de comparación con estadísticas para las poblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	N	Unidades	R ²	Pendiente	Intersección	Rango
CD3+	336	%	0,99	1,00	0,50	1,29–94,83
		células/μL	0,99	1,03	3,96	6– 6.553
CD3+CD4+	336	%	1,00	1,01	-0,26	0,12–84,65
		células/μL	0,99	1,02	-0,04	1– 3.194
CD3+CD8+	336	%	0,99	1,00	-0,08	0,26–82,93
		células/μL	0,99	1,02	-0,59	1– 5.774

Precisión dentro del laboratorio (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Se realizó un estudio de 21 días en el laboratorio de BD Biosciences para evaluar la precisión dentro del laboratorio.⁴⁵ Las estimaciones de precisión para los porcentajes y los recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos se obtuvieron en los cuatro citómetros de flujo BD FACSLytic, con cuatro operadores, mediante la adquisición de cuatro concentraciones de analitos, con control basal CD-Chex Plus® ‡ CD4 y control CD-Chex Plus®, tincionados por duplicado con cuatro

lotes de BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4. Se analizaron dos corridas distintas durante cada uno de los 21 días de ensayos para un total de 42 corridas.

Las siguientes tablas presentan los desvíos estándar (DE) y los coeficientes de variación (%CV) para la precisión y la repetibilidad dentro del laboratorio de los porcentajes y los recuentos absolutos de poblaciones de linfocitos, respectivamente.

‡ CD-Chex Plus es marca registrada de Streck, Inc.

Tabla 5 Precisión dentro del laboratorio de los porcentajes de poblaciones de linfocitos en concentraciones bajas de analitos (CDL^a) (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	Media (%)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del laboratorio)
CD3+	57,31	1,13	1,18
CD3+CD4+	11,66	0,62	0,64
CD3+CD8+	40,36	1,04	1,06

a. CDL = CD-Chex Plus CD4 Low control (control basal)


 Karina Valeria Traverso
 Co-Directora Técnica / Apoderada
 M.N. 14.733 - M.P. 20.293
 Becton Dickinson Argentina SRL

Tabla 6 Precisión dentro del laboratorio de los porcentajes de poblaciones de linfocitos en concentraciones normales de analitos (CDN^a) (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	Media (%)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del laboratorio)
CD3+	76,81	0,80	0,83
CD3+CD4+	50,74	1,01	1,02
CD3+CD8+	22,22	0,80	0,80

a. CDN = CD-Chex Plus control

Tabla 7 Precisión dentro del laboratorio de los porcentajes de poblaciones de linfocitos en concentraciones bajas de analitos (CDL) (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	Media (%)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del laboratorio)
CD3+	869,06	4,24	4,32
CD3+CD4+	176,91	6,59	6,67
CD3+CD8+	612,12	4,55	4,65

Tabla 8 Precisión dentro del laboratorio de los porcentajes de poblaciones de linfocitos en concentraciones normales de analitos (CDN) (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	Media (%)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del laboratorio)
CD3+	1729,61	3,85	4,03
CD3+CD4+	1142,52	4,04	4,18
CD3+CD8+	500,42	5,56	5,67

Reproducibilidad entre laboratorios (Citómetro de flujo BD FACSLyric)

Se realizó un estudio para evaluar la reproducibilidad entre laboratorios. Se suministró un lote individual de cada control de proceso, el control basal CD-Chex Plus CD4 y el control CD-Chex Plus a cada uno de los cuatro laboratorios clínicos. Las muestras de control se tincionaron con reactivo BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4. Se analizaron dos corridas distintas durante cada uno de los 5 días de ensayos no consecutivos para un total de 10 corridas.

Las siguientes tablas presentan los desvíos estándar (DE) y los coeficientes de variación (%CV) para la reproducibilidad (precisión total) de los porcentajes y los recuentos absolutos de poblaciones de linfocitos, respectivamente.

Tabla 9 Reproducibilidad entre laboratorios de los porcentajes de las poblaciones de linfocitos en concentraciones bajas de analitos (CDL) (Citómetro de flujo BD FACSLyric)

Población de linfocitos	Media (%)	DE
CD3+	57,14	1,21
CD3+CD4+	12,12	0,61
CD3+CD8+	40,74	1,12

Tabla 10 Reproducibilidad entre laboratorios de los porcentajes de las poblaciones de linfocitos en concentraciones normales de analitos (CDN) (Citómetro de flujo BD FACSLyric)

Población de linfocitos	Media (%)	DE
CD3+	76,64	0,91
CD3+CD4+	51,67	1,58
CD3+CD8+	23,23	0,85

Tabla 11 Reproducibilidad entre laboratorios de los recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos en concentraciones bajas de analitos (CDL) (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	Media (%)	%CV
CD3+	881,62	5,03
CD3+CD4+	187,01	7,30
CD3+CD8+	628,51	5,23

Tabla 12 Reproducibilidad entre laboratorios de los recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos en concentraciones normales de analitos (CDN) (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	Media (%)	%CV
CD3+	1746,97	4,65
CD3+CD4+	1177,59	5,17
CD3+CD8+	529,63	6,05

Repetibilidad de la sangre entera (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Se realizó un estudio de repetibilidad de sangre entera para demostrar la repetibilidad del sistema en 53 muestras de donantes. Cada muestra de donante se tincionó por duplicado con el reactivo BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en los tubos BD Trucount y se corrieron en 12 instrumentos; se realizaron en total 24 corridas por muestra.

Tabla 13 Repetibilidad de la sangre entera en las poblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	Media (%)	Repetibilidad dentro de la corrida (DE)	Repetibilidad total (DE)
CD3+	73,54	0,96	0,96
CD3+CD4+	33,46	0,83	0,83
CD3+CD8+	37,93	0,93	0,93

Tabla 14 Repetibilidad de la sangre entera en los recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLyric)

Población de linfocitos	Media (células/ μ L)	Repetibilidad dentro de la corrida %CV	Repetibilidad total %CV
CD3+	1400,10	4,49	4,61
CD3+CD4+	633,59	5,32	5,40
CD3+CD8+	726,59	5,42	5,53

Estabilidad (Citómetro de flujo BD FACSLyric)

La estabilidad del reactivo BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en los tubos BD Trucount se analizó mediante el estudio de:

- Los cambios asociados con la conservación de la sangre entera antes de la tinción
- Los cambios producidos por el tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de datos
- El efecto combinado de los dos

Las muestras de sangre entera se sometieron a ensayos hasta 51 horas luego de la extracción. Se realizaron ensayos en las muestras tincionadas hasta 26 horas luego de la tinción. Todas las muestras se conservaron a temperatura ambiente (20°C–25°C) antes de la tinción o adquisición.

Sobre la base de los resultados de este estudio, recomendamos tincionar las muestras dentro de las 48 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 24 horas de la tinción.

Linealidad (Citómetro de flujo BD FACSLyric)

Se evaluó la linealidad para el citómetro de flujo BD FACSLyric con mediciones por triplicado de 11 concentraciones igualmente espaciadas de glóbulos blancos.

Se observó que las poblaciones de linfocitos fueran lineales en los siguientes rangos. Ver la tabla 15.

Tabla 15 Rangos lineales de las poblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	Rango (células/ μ L)
CD3+	3– 5.148
CD3+CD4+	5– 2.931
CD3+CD8+	7– 3.480

Rango de medición analítica (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Se estableció el rango de medición analítica (AMR) para BD Multitest CD3/CD8/ CD45/CD4 en el citómetro de flujo BD FACSLytic. Se determinó el límite inferior del AMR a partir del estudio del límite de cuantificación (LoQ); el límite superior del AMR se determinó con el estudio de comparación de métodos.

Tabla 16 AMR de las poblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	AMR (células/ μ L)
CD3+	15-5.000
CD3+CD4+	10-3.000
CD3+CD8+	11-3.000

Citómetro de flujo BD FACSCanto II**Método de comparación (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)**

Los porcentajes para las poblaciones de linfocitos y los recuentos absolutos se calcularon con BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en los tubos BD Trucount y se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSCanto II con el software clínico BD FACSCanto versión 2.1. Los resultados se compararon con resultados obtenidos del reactivo analizado con el citómetro de flujo BD FACSCanto con el software clínico BD FACSCanto, versión 2.0.

Las muestras de sangre entera se recolectaron en forma aleatoria en un laboratorio clínico. Las estadísticas de regresión se informan en la Tabla 17.

Tabla 17 Análisis de regresión para los porcentajes y los recuentos absolutos de la población (citómetro de flujo BD FACSCanto II)

Población	N	Unidades	R ²	Pendiente	Intersección	Rango
CD3+	104	%	0,984	0,97	2,72	52-92
		células/ μ L	0,991	0,97	27,59	221-3.873
CD3+CD4+	104	%	0,994	1,01	0,20	2-57
		células/ μ L	0,986	0,95	18,25	11-1.905
CD3+CD8+	104	%	0,993	1,00	0,34	11-81
		células/ μ L	0,988	0,95	28,36	68-3.577

Precisión (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)

Se realizaron estimaciones de precisión en el laboratorio de BD Biosciences en dos muestras que se corrieron por duplicado con dos niveles distintos de concentración de analitos. Las muestras se corrieron en tres instrumentos distintos con tres operadores distintos (un operador y un instrumento por día).

Se analizaron dos corridas distintas durante cada uno de los 21 días de ensayos para un total de 42 corridas. La calibración se realizó con microesferas de 7 colores BD FACS antes de cada corrida, para un total de 42 corridas. Se utilizaron un lote de reactivos y un lote de calibradores durante la duración del estudio.

Las siguientes tablas presentan los desvíos (DE) y los coeficientes de variación (%CV) para la precisión y la repetibilidad dentro del dispositivo de los porcentajes y los recuentos absolutos de poblaciones de linfocitos, respectivamente.


 Karina Valeria Traverso
 Co-Directora Técnica / Apoderada
 M.N. 14.733 - M.P. 20.293
 Becton Dickinson Argentina SRL

Tabla 18 Precisión de los porcentajes de las poblaciones de linfocitos en concentraciones bajas de analitos (CDL^a) (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Población de linfocitos	Media (%)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+	54,1	0,96	0,98
CD3+CD4+	10,3	0,53	0,53
CD3+CD8+	43,2	1,33	1,34

a. CDL = CD-Chex Plus CD4 Low control

Tabla 19 Precisión de los porcentajes de las poblaciones de linfocitos en concentraciones normales de analitos (CDC^a) (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Población de linfocitos	Media (%)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+	73,0	0,63	0,67
CD3+CD4+	46,8	0,81	0,82
CD3+CD8+	25,4	0,78	0,80

a. CDC = CD-Chex Plus control

Tabla 20 Precisión de los recuentos absolutos en concentraciones bajas de analitos (CDL) (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)

Población linfocitos	de	Media (células/ μ L)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+		1086,0	3,5	3,6
CD3+CD4+		205,6	5,9	5,9
CD3+CD8+		866,0	3,8	3,9

Tabla 21 Precisión de los recuentos absolutos en concentraciones normales de analitos (CDC) (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)

Población linfocitos	de	Media (células/ μ L)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+		2105,4	2,7	2,9
CD3+CD4+		1347,1	3,6	3,8
CD3+CD8+		731,4	4,7	4,7

Estabilidad (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)

La estabilidad del reactivo BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en los tubos BD Trucount se analizó mediante el estudio de:

- Los cambios asociados con la conservación de la sangre entera antes de la tinción
- Los cambios producidos por el tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de datos
- El efecto combinado de los dos

Las muestras de sangre entera se sometieron a ensayos hasta 48 horas luego de la extracción. Se realizaron ensayos en las muestras tincionadas hasta 24 horas luego de la tinción. Todas las muestras se conservaron a temperatura ambiente (20°C–25°C) antes de la tinción o adquisición.

Sobre la base de los resultados de este estudio, recomendamos tincionar las muestras dentro de las 48 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 24 horas de la tinción.

Linealidad (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)

Se evaluó la linealidad para el sistema BD FACSCanto II con un rango de concentración de glóbulos blancos de 0 a $3,3 \times 10^4$ glóbulos blancos/ μ L. Se observó que los resultados fueron lineales en los siguientes rangos.

Población	Rango (células/ μ L)
CD3+	6– 5.998
CD3+CD4+	1– 3.669
CD3+CD8+	2– 2.324

Citómetro de flujo BD FACSCanto

Método de comparación (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Los porcentajes para las poblaciones de linfocitos y los recuentos absolutos se obtuvieron con BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en los tubos BD Trucount y se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSCanto con el software clínico BD FACSCanto versión 2.0. Los resultados se compararon con los resultados de los reactivos analizados en el citómetro de flujo BD FACSCanto con el software BD Multiset.

Las muestras de sangre entera se recolectaron en forma aleatoria en un laboratorio clínico. Las estadísticas de regresión se informan en la Tabla 22.

Población	N	Unidades	R	Pendiente	Intersección	Rango
CD3+	108	%	0,993	1,00	-0,17	40-93
		células/ μ L	0,987	0,99	-6,27	75-5.257
CD3+CD4+	108	%	0,998	0,99	0,26	1-70
		células/ μ L	0,991	0,97	10,80	3-3.211
CD3+CD8+	108	%	0,996	1,00	0,27	10-81
		células/ μ L	0,983	0,96	24,60	68-2.754

Precisión (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Se realizaron estimaciones de precisión en el laboratorio de BD Biosciences en dos muestras que se corrieron por duplicado con dos niveles distintos de concentración de analitos. Las muestras se corrieron en tres instrumentos distintos con tres operadores distintos (un operador y un instrumento por día).

Se analizaron dos corridas distintas durante cada uno de los 20 días de ensayos para un total de 40 corridas. La calibración se realizó con microesferas de 7 colores BD FACS antes de cada corrida, para un total de 40 corridas. Se utilizaron un lote de reactivos y un lote de calibradores durante la duración del estudio.

Las siguientes tablas presentan los desvíos (DE) y los coeficientes de variación (%CV) para la precisión y la repetibilidad dentro del dispositivo de los porcentajes y los recuentos absolutos de poblaciones de linfocitos, respectivamente.

Tabla 23 Precisión de los porcentajes de las poblaciones de linfocitos en concentraciones bajas de analitos (MCL^a) (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Población linfocitos	de	Media (células/ μ L)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+		57,5	1,16	1,22
CD3+CD4+		17,6	0,73	0,77
CD3+CD8+		39,1	0,97	1,17

a. MCL = BD Multi-Check CD4 Low control

Tabla 24 Precisión de los porcentajes de las poblaciones de linfocitos en concentraciones normales de analitos (MCN^a) (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Población linfocitos	de	Media (células/ μ L)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+		69,9	1,15	1,21
CD3+CD4+		50,3	1,04	1,18
CD3+CD8+		19,8	1,03	1,15

a. MCN = BD Multi-Check control

Tabla 25 Precisión de los recuentos absolutos en concentraciones bajas de analitos (MCL) (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Población linfocitos	de	Media (células/ μ L)	%CV (Repetibilidad)	% CV (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+		307,4	3,2	4,1
CD3+CD4+		94,9	5,8	6,5
CD3+CD8+		210,7	5,1	5,8

Tabla 26 Precisión de los recuentos absolutos en concentraciones normales de analitos (MCN) (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Población de linfocitos	Media (células/ μ L)	%CV (Repetibilidad)	% CV (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+	743,9	3,9	4,8
CD3+CD4+	539,4	5,7	5,9
CD3+CD8+	212,8	6,4	7,1

Estabilidad (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

La estabilidad del reactivo BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en los tubos BD Trucount se analizó mediante el estudio de:

- Los cambios asociados con la conservación de la sangre entera antes de la tinción
- Los cambios producidos por el tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de datos
- El efecto combinado de los dos

Las muestras de sangre entera se sometieron a ensayos hasta 48 horas luego de la extracción. Se realizaron ensayos en las muestras tincionadas hasta 24 horas luego de la tinción. Todas las muestras se conservaron a temperatura ambiente (20°C–25°C) antes de la tinción o adquisición.

Sobre la base de los resultados de este estudio, recomendamos tincionar las muestras dentro de las 48 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 24 horas de la tinción.

Linealidad (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Se evaluó la linealidad para el sistema BD FACSCanto con un rango de concentración de glóbulos blancos de 0 a 3,0 x 10⁴ glóbulos blancos/ μ L. Se observó que los resultados fueron lineales en los siguientes rangos.

Población	Rango (células/ μ L)
CD3+	48– 9.627
CD3+CD4+	29– 5.827
CD3+CD8+	22– 4.076

Citómetro de flujo BD FACSCalibur**Método de comparación (Citómetro de flujo BD FACSCalibur)**

Los porcentajes de las poblaciones de linfocitos y los recuentos absolutos realizados con BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en los tubos BD Trucount se compararon con los resultados de BD Tritest™ CD3/CD4/CD45 o CD3/ CD8/CD45 en los tubos BD Trucount.

Se recolectaron muestras de sangre entera, normales y anormales, en forma aleatoria en dos laboratorios clínicos y se evaluaron en ambos sistemas. El análisis de regresión de la Tabla 27 indica que los resultados son esencialmente equivalentes.

Tabla 27 Análisis de regresión para los porcentajes y los recuentos absolutos de la población (citómetro de flujo BD FACSCanto)

Población	N	Unidades	R	Pendiente	Intersección	Rango
CD3+	124	%	1,0	1,002	0,254	22– 90
		células/ μ L	0,98	1,028	-20,451	189– 2.987
CD3+CD4+	124	%	1,0	0,996	-0,434	1– 62
		células/ μ L	0,98	1,015	-7,692	93– 1.904
CD3+CD8+	124	%	1,0	1,018	-0,383	13– 78
		células/ μ L	0,99	1,001	2,494	132– 2.229

Precisión dentro de la muestra (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Se realizaron estimaciones de reproducibilidad dentro de las muestras en tres laboratorios clínicos a partir de cinco réplicas de cada muestra, normales y anormales, recolectadas de donantes. Se suministraron las medias, los DE y los CV para los porcentajes y los recuentos absolutos de las poblaciones mayores a 100 células/ μ L en las Tablas 28 y 29.


 Karina Valeria Traverso
 Co-Directora Técnica / Apoderada
 M.N. 14.733 - M.P. 20.293
 Becton Dickinson Argentina SRL

Tabla 28 Reproducibilidad dentro de la muestra de los porcentajes del subgrupo (citómetro de flujo BD FACSCalibur)

Población	N	Media (%)	DE
CD3+	46	72,0	1,06
CD3+CD4+	46	26,1	0,85
CD3+CD8+	46	42,0	0,93

Tabla 29 Reproducibilidad dentro de la muestra de los recuentos absolutos (citómetro de flujo BD FACSCalibur)

Población	N	Media (células/ μ L)	%CV
CD3+	46	1219,9	6,34
CD3+CD4+	38	565,2	7,02
CD3+CD8+	46	687,8	6,79

Estabilidad (Citómetro de flujo BD FACSCalibur)

La estabilidad del reactivo BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 en los tubos BD Trucount se analizó mediante el estudio de:

- Los cambios asociados con la conservación de la sangre entera antes de la tinción
- Los cambios producidos por el tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de datos
- El efecto combinado de los dos

Las muestras de sangre entera se sometieron a ensayos hasta 48 horas luego de la extracción. Se realizaron ensayos en las muestras tincionadas hasta 24 horas luego de la tinción. Todas las muestras se conservaron a temperatura ambiente (20°C–25°C) antes de la tinción o adquisición.

Sobre la base de los resultados de este estudio, recomendamos tincionar las muestras dentro de las 48 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 24 horas de la tinción.

Linealidad (Citómetro de flujo BD FACSCalibur)

Se evaluó la linealidad en una concentración de glóbulos blancos de $0,2 \times 10^3$ hasta $29,7 \times 10^3$ glóbulos blancos/ μL y una concentración de linfocitos de $0,1 \times 10^3$ hasta $9,0 \times 10^3$ linfocitos/ μL . Se observó que los resultados fueron lineales en el rango CD3+, en el rango CD3+CD4+ y en el rango CD3+CD8+.

13. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Causa probable	Solución
La discriminación entre restos celulares y células es deficiente.	La muestra es de baja calidad.	Verificar la viabilidad.
	La muestra es demasiado antigua.	Obtener una nueva muestra y tincionarla sin demora.
La tinción es débil o tenue.	La concentración celular fue demasiado elevada en la etapa de tinción.	Verificar la concentración de las células y ajustar según sea necesario.
	Las células tincionadas se conservaron demasiado tiempo antes de la adquisición.	Repetir la tinción con una muestra nueva y realizar la adquisición sin demora.
Se registraron pocas células o ninguna.	La concentración celular es demasiado baja.	Volver a suspender una nueva muestra con una concentración más alta. Repetir la tinción y la adquisición.
	El citómetro funciona mal.	Resolver los problemas del instrumento. Consultar las IU del citómetro para obtener más información.

GARANTÍA

Salvo indicación en contrario en cualquiera de las condiciones generales de venta de BD para los clientes fuera de los Estados Unidos, se aplica la siguiente garantía a la compra de estos productos.

SOLO SE GARANTIZA LA CANTIDAD Y EL CONTENIDO INDICADO EN EL RÓTULO DEL PRODUCTO AL MOMENTO DE LA ENTREGA AL CLIENTE. POR LA PRESENTE, BD DECLINA SU RESPONSABILIDAD POR TODAS LAS OTRAS GARANTÍAS, EXPRESAS O IMPLÍCITAS, QUE INCLUYEN LA

GARANTÍA DE COMERCIABILIDAD O NO VIOLACIÓN O DE IDONEIDAD PARA UN USO DETERMINADO. LA RESPONSABILIDAD EXCLUSIVA DE BD SE LIMITA AL REEMPLAZO DE LOS PRODUCTOS O AL REEMBOLSO DEL PRECIO DE COMPRA. BD NO ES RESPONSABLE POR LOS DAÑOS A LA PROPIEDAD NI POR DAÑOS ESPECIALES NI INDIRECTOS, INCLUIDAS LAS LESIONES PERSONALES O LAS PÉRDIDAS ECONÓMICAS CAUSADAS POR EL PRODUCTO.

REFERENCIAS

1. Schmidt RE. Anticuerpos monoclonales para diagnóstico de inmunodeficiencias. *Blut*. 1989; 59:200-206.
2. Nicholson JKA. Uso de la citometría de flujo en la evaluación y el diagnóstico de enfermedades de inmunodeficiencia primaria y secundaria. *Arch Pathol Lab Med*. 1989; 113:598-605.
3. Foucar K, Goeken JA. Aplicación clínica de las técnicas inmunológicas en el diagnóstico de trastornos linfoproliferativos y de inmunodeficiencia. *Laboratorio Médico*. 1982; 13:403-413.
4. Cohen SB, Weetman AP. Linfocitos intersticiales e intraepiteliales activados en la enfermedad autoinmune de tiroides. *Acta Endocrinol*. 1988; 119:161-166.
5. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneidad de las poblaciones de células T inmunoregulatorias en el lupus eritematoso sistémico; correlación con las características clínicas. *Am J Med*. 1982; 72:783-790.
6. Giorgi JV, Hultin LE. Alteraciones en las poblaciones de linfocitos e inmunofenotipificación por citometría de flujo en la enfermedad por VIH. *Boletín de Inmunología Clínica*. 1990; 10:55-61.
7. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Aplicación de la citometría de flujo al estudio de la infección por VIH. *SIDA*. 1990; 4:479-497.
8. Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Función celular del supresor defectuoso mediada por líneas de células T8+ de pacientes con esclerosis múltiple progresiva. *J Immunol*. 1986; 137:3436-3439.

9. Centros para el Control de Enfermedades. 1997 Pautas revisadas para realizar determinaciones de las células CD4+ T en personas con virus de inmunodeficiencia humana (VIH). MMWR. 1997; 46:1-29.
10. Nicholson JKA, Jones BM, Hubbard M. Recuentos de linfocitos T con CD4 en muestras de sangre entera con un ensayo en un tubo individual con tres colores. Citometría. 1993; 14:685-689.
11. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Suplemento sobre los tres colores en las pautas del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID), División de SIDA (DAIDS) para inmunotipificación en la citometría de flujo. Citometría. 1996; 26:227-230.
12. Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Uso de la fluorescencia en CD45 y de la dispersión lateral para separar linfocitos cuando se usa el procedimiento de lisado de la sangre entera y la citometría de flujo. Citometría. 1996; 26: 16- 21.
13. Haynes BF. Resumen de los estudios con células T realizado durante el Segundo Taller y Conferencia Internacional sobre Antígenos de Diferenciación en Leucocitos Humanos. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. *Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
14. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Las subunidades con unión no covalente de 22 y 28 kd son asimiladas rápidamente por las células T que reaccionan con el anticuerpo Anti-Leu-4. J Immunol. 1983; 131:536-539.
15. Knowles RW. Análisis inmunoquímico de los antígenos específicos para células T. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. *Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986; 259-288.
16. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD y otros. Antígenos de la membrana dependientes del timo en hombres; inhibición de linfólisis mediada por células mediante anticuerpos monoclonales para el antígeno TH2. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 1981; 78:544-548.
17. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Informe conjunto del primer taller internacional sobre los antígenos de diferenciación para leucocitos

- humanos realizado por investigadores de los laboratorios participantes: Protocolo para T2. Editores: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF. Tipificación de leucocitos. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:25-60.
18. Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Familia sin linaje, LFA-1 y antígenos comunes para leucocitos; clústeres nuevos y previamente definidos. Editores: McMichael AJ, ed. Tipificación de leucocitos III: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
 19. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Los anticuerpos anti-Leu-3/T4 reaccionan con los monocitos/macrófagos y las células de Langerhans. J Immunol. 1983; 131:212-216.
 20. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM y otros. Expresión citoplasmática del antígeno anti-CD3 como marcador diagnóstico para neoplasias de células T inmaduras. Sangre. 1988; 71:603-612.
 21. Brenner MB, McClean J, Dialynas DP y otros. Identificación de un segundo receptor putativo de células T. Nature. 1986; 322:145-149.
 22. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. El complejo e células T receptoras/CD3: un ensamble proteico dinámico. Annu Rev Immunol. 1988; 6:629-662.
 23. Moebius U. Informe del clúster: CD8. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
 24. Rudd CE, Burgess KE, Barber EK, Schlossman SF. Anticuerpos monoclonales para las cantidades variables de precipitado de antígenos anti-CD4 y anti-CD8 de la actividad de p56lck asociada con CD4/CD8. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:326-327.
 25. Gallagher PF, Fazekas de St. Groth B, Miller JFAP. Las moléculas de CD4 y de CD8 se pueden asociar físicamente con el mismo

- receptor de las células T. Proc Natl Acad Sci, EE.UU. 1989; 86:10044-10048.
26. Anderson P, Blue M-L, Morimoto C, Schlossman SF. El entrecruzamiento de T3 (CD3) con T4 (CD4) favorece la proliferación de linfocitos T inactivados. J Immunol. 1987; 139:678-682.
 27. Eichmann K, Jönsson J-I, Falk I, Emrich F. Activación efectiva de los linfocitos T murinos inactivados mediante el entrecruzamiento de concentraciones submitogénicas de los receptores del antígeno de las células T con Lyt-2 o L3T4. Eur J Immunol. 1987; 17:643-650.
 28. Schwinzer R. Informe del clúster: CD45/CD45R. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
 29. Comité Organizador del Cuarto Taller Internacional sobre Antígenos de Diferenciación de los Leucocitos Humanos. Apéndice A: Guía CD. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press Inc; 1989:1074-1093.
 30. Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. El antígeno anti-CD4 (T4) es un componente esencial del receptor para el retrovirus del SIDA. Nature. 1984; 312:763-767.
 31. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. El gen T4 codifica el receptor del virus del SIDA y está expresado en el sistema inmune y en el cerebro. *Células*. 1986; 47:333-348.
 32. Centros para el Control de Enfermedades. Actualización sobre las perspectivas en la prevención de enfermedades y promoción de la salud: precauciones universales para la prevención en la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis B y otros patógenos de la sangre en entornos sanitarios. MMWR. 1988; 37:377-388.
 33. Protección del personal de laboratorio de las infecciones adquiridas en el ámbito laboral; Pautas aprobadas — Cuarta

- edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2014. Documento CLSI M29-A4.
34. Procedimientos para la recolección de muestras de sangre con fines diagnósticos por venopunción: Estándar aprobado—Sexta edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2007. Documento CLSI GP41-A6.
35. Enumeración de poblaciones de células definidas inmunológicamente mediante citometría de flujo; directrices aprobadas—Segunda edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2007. Documento CLSI H42-A2. 42
36. Giorgi JV. Mediciones de las poblaciones de linfocitos: importancia en la medicina clínica. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL. Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:236- 246.
37. Jackson AL, Warner NL. Preparación, tinción y análisis por citometría de flujo de leucocitos periféricos en la sangre. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL. Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:226- 235.
38. Lista de verificación del citómetro de flujo.
http://www.cap.org/apps/docs/laboratory_accreditation/laboratory_accreditation_checklist_order_form_.pdf
39. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influencia del origen racial en la distribución de las poblaciones de células T y de los linfocitos con Leu-11 positivo en donantes de sangre sanos. Inmunología diagnóstica. 1985;03:33-37.
40. Angadi CV. Ausencia de epitope Leu-3a en los linfocitos colaboradores T (CD4). J Clin Lab Anal. 1990; 4:193-195.
41. Definición, establecimiento y verificación de los intervalos de referencia en el laboratorio clínico —Tercera edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2010. Documento CLSI EP28 - A3c.
42. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpoblaciones de células humanas natural killer definidas por la

- expresión de los antígenos Leu-7 (HNK-1) y Leu-11 (NK-15). J Immunol. 1983; 131:1789-1796.
43. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivación de las células H9 infectadas con VIH en preparaciones de sangre entera con reactivos de lisis/fijación en la citometría de flujo. J Immunol Methods. 1993; 160:215-218.
44. Procedimiento de medición y estimación de sesgo con muestras de pacientes; Pautas aprobadas—Tercera edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2013. Documento CLSI EP09-A3.
45. Evaluación de la precisión de los procedimientos de medición cuantitativa— Tercera edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2014. Documento CLSI EP05-A3.



Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

BD Multitest™

CD3/CD16+CD56/CD45/CD19

50 ensayos por kit —Número de catálogo 340500

50 ensayos por kit con tubos BD Trucount™ —Número de catálogo
340492

DISPOSITIVOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO (IVD)

**Solo con
prescripción
médica**

© 2017 BD. La marca BD, el logotipo de BD y todas las otras marcas registradas pertenecen a Becton, Dickinson and Company.

8/2017



23-3601-04

Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA EE.UU. 95131
EE.UU.

bdbiosciences.com

ClinicalApplications@bd.com


Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

Contenido

1. USO PREVISTO	4
2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN	4
3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO	4
4. REACTIVO.....	5
Composición del reactivo	5
Reactividad cruzada	6
Precauciones	7
Conservación y manipulación.....	7
5. INSTRUMENTOS	8
6. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	9
Condiciones de interferencia	10
7. REACTIVOS Y MATERIALES	10
Reactivo suministrado	10
Reactivos y materiales requeridos pero que no se suministran	11
8. INSTRUCCIONES DE USO	12
Dilución de la solución lisante BD FACS	12
Técnica de pipeteo inverso	12
Para realizar el control de calidad:.....	13
Tinción de las células.....	13
Adquisición de las muestras.....	14
9. RESULTADOS.....	15
Cálculo de los recuentos absolutos	15
Datos representativos	15
10. LIMITACIONES	18
11. VALORES PREVISTOS	18
Citómetro de flujo BD FACSLytic	19
Citómetros de flujo FACSCanto II, BD FACSCanto y BD FACSCalibur	19
12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO.....	20
Citómetro de flujo BD FACSLytic	20
Citómetro de flujo BD FACSCanto II	27

340500 IU ESP - 3

Citómetro de flujo BD FACSCanto	30
Citómetro de flujo BD FACSCalibur	33
13. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS	35
GARANTÍA.....	36
REFERENCIAS	36


Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

1. USO PREVISTO

BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 con los tubos BD Trucount™ opcionales está diseñado para uso con los citómetros de flujo BD FACSLyric™, BD FACSCanto™ II, BD FACSCanto™ y BD FACSCalibur™ para obtener recuentos absolutos de las siguientes poblaciones de linfocitos humanos maduros en sangre periférica para inmunofenotipificación:

- Linfocitos T (CD3+)
- Linfocitos natural killer (NK) (CD3–CD16+ y/o CD56+)

Linfocitos B (CD3–CD19+)

Se indica el uso de este reactivo en la evaluación inmunológica de individuos normales y en pacientes que presentan, en forma efectiva o presunta, deficiencia del sistema inmune.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los linfocitos humanos se pueden dividir en tres grupos importantes de acuerdo con su función biológica y la expresión antigénica de la superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK.

Los linfocitos NK identificados como CD3– y CD16+ y/o CD56+ han demostrado ejercer una actividad citotóxica contra tumores y células infectadas con VIRUS.¹ La citotoxicidad ejercida por los linfocitos NK no requiere la presencia de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por su sigla en inglés) clase I o clase II en la célula diana.²

Los porcentajes o recuentos de Linfocitos T y CD3+CD4+ se utilizan para caracterizar y monitorear algunas formas de inmunodeficiencia^{3–5} y de enfermedades autoinmunes.^{6,7}

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se agrega sangre entera al reactivo, los anticuerpos identificados con el fluorocromo en el reactivo se unen específicamente a los antígenos de superficie del leucocito. Durante la adquisición, las

células atraviesan el haz de láser y dispersan la luz del láser. Las células tincionadas tienen fluorescencia. La dispersión y las señales de fluorescencia, detectadas por el instrumento, brindan información sobre el tamaño de la célula, la complejidad interna y la intensidad relativa de la fluorescencia. Los reactivos de BD Multitest emplean la estimulación por fluorescencia, lo que permite el gating (separación) por fluorescencia directa de la población de linfocitos,⁸⁻¹⁰ para reducir la contaminación con glóbulos rojos no lisados o nucleados en el gating.

Cuando se utilizan los tubos BD Trucount, un volumen predeterminado de la muestra se tinciona directamente en un tubo BD Trucount. El pellet liofilizado del tubo se disuelve y se libera una cantidad determinada de microesferas fluorescentes. Durante el análisis, la cantidad absoluta (células/ μ L) de células separadas en la muestra se pueden determinar mediante la comparación de eventos con células en los eventos con microesferas. Si se utiliza un software de BD adecuado, específico para el citómetro (consultar la Tabla 1, sección de Instrumentos), los recuentos absolutos se realizan con el software.

Si el análisis de datos se realiza en forma manual con software como BD CellQuest™ Pro, dividir simplemente la cantidad de eventos celulares positivos por la cantidad de eventos con microesferas y luego multiplicar por la cantidad de microesferas BD Trucount™ por pellet dividido por el volumen de la muestra en μ L.

4. REACTIVO

Composición del reactivo

BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 contiene CD3 marcado con FITC, clon SK7;¹¹⁻¹³ CD16 marcado con PE, clon B73.1;¹⁵⁻¹⁶ y CD56, Clon NCAM 16.2;¹⁷, CD45 marcado con PerCP, clon 2D1 (HLe-1);¹⁸ y CD19 marcado con APC, clon de SJ25C1.¹⁹

CD 3 identifica los linfocitos T y reconoce la cadena épsilon del complejo (TCR) del antígeno anti-CD3/receptor del antígeno de las células T.²⁰ Este complejo está compuesto por al menos 6 proteínas cuyo peso molecular oscila entre 20 y 30 kilodaltones (kDa).²¹ El

antígeno reconocido con los anticuerpos anti-CD3 se asocia de manera no covalente con TCR α/β o γ/δ (70 a 90 kDa).²²

CD16 y CD56 juntos facilitan la identificación de la población de linfocitos NK.^{1,9} CD16 reconoce el antígeno del linfocito NK humano de 50- a 70-kDa que es un receptor Fc para IgG.^{15,14,23} El antígeno CD16 reacciona de manera variable con los granulocitos.¹⁴ CD56 reconoce un dominio del tipo de la inmunoglobulina extracelular común a tres pesos moleculares (120, 140 y 180 kDa) de la molécula de adhesión celular neural (NCAM).²⁴⁻²⁶

CD45 identifica leucocitos y reconoce el antígeno de los leucocitos humanos 180- a 220-kDa que forma parte de la familia de antígenos comunes de leucocitos (LCA, por su sigla en inglés).²⁷

CD19 identifica los linfocitos B y reconoce un antígeno de 90-kDa que está presente en los linfocitos humanos B en todos los estadios de maduración, si bien se pierde en las células de plasma.²⁸ El antígeno anti-CD19 puede participar en la activación y proliferación de los linfocitos B.²⁸

Los anticuerpos anti-CD3, anti-CD16, anti-CD45 y anti-CD19 están compuestos de cadenas pesadas murinas $\gamma 1$ y cadenas livianas kappa. El anticuerpo anti-CD56 está compuesto de cadenas pesadas murinas $\gamma 2b$ y cadenas livianas kappa.

Los valores de concentración de los anticuerpos conjugados se muestran en la siguiente tabla:

Concentración del	reactivo ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
CD3 FITC	2,3
CD16+CD56 PE	2,75
CD45 PerCP	7,50
CD19 APC	2,3

Reactividad cruzada

El antígeno anti-CD16 está expresado en los neutrófilos.² El antígeno anti-CD56 está presente en aproximadamente 5% de los linfocitos en

sangre periférica.²

Precauciones

- No use el reactivo si observa algún cambio en el aspecto. La precipitación o la descoloración indican inestabilidad o deterioro.
- El reactivo del anticuerpo contiene ázida de sodio como conservante. Sin embargo, tenga cuidado de evitar la contaminación microbiana que puede arrojar resultados erróneos.
- Si usa los tubos BD Trucount, calibre las pipetas para que den exactamente 50 µL de muestra. Recomendamos utilizar la técnica de pipeteo inverso de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la pipeta.
- El conteo de microesferas varía por lote de los tubos BD Trucount. Es muy importante usar el recuento de microesferas del lote en uso de los tubos BD Trucount cuando se ingresa este valor en el software o cuando se calcula un recuento absoluto de forma manual. No mezclar lotes de distintos tubos en la misma corrida.
- Los tubos BD Trucount están diseñados para usar con un procedimiento específico de lisado/no lavado. No intente fijar un umbral en dispersión frontal (FSC) para la recopilación de datos.

ADVERTENCIA Todas las muestras y materiales biológicos con los que entra en contacto se consideran peligros biológicos. Manipular como si existiera la posibilidad de transmitir infecciones ^{29,30} y eliminar con las precauciones adecuadas de acuerdo con las normas federales, estatales y locales. Nunca cargue la pipeta con la boca. Use indumentaria, gafas y guantes de protección adecuados.

Conservación y manipulación

- Conservar el reactivo a una temperatura de 2°C–8°C. No use luego de la fecha de caducidad del rótulo.
- No congele el reactivo ni lo exponga a la luz directa durante la conservación o la incubación con células. Mantenga el frasco con el reactivo seco.
- Conservar los tubos BD Trucount en el envase original a una temperatura de 2°C–25°C. Para evitar la condensación potencial, abra la bolsa solo luego de que se alcanzó la temperatura ambiente y

volver a sellarla con cuidado luego de retirar el tubo. Examine el disecante cada vez que se abre la bolsa. Si el color del disecante cambió de azul a lavanda, descarte el resto de los tubos. Use los tubos dentro del plazo de 1 hora después de sacarlo del envase. Una vez que se abrió el envase, los tubos conservan la estabilidad durante 1 mes. No usar pasada la fecha de caducidad del rótulo.

5. INSTRUMENTOS

BD Multitest CD3/ CD16+CD56/CD45/CD19 y los tubos BD Trucount están diseñados para usar en un citómetro de flujo equipado con el hardware y el software de computación adecuado. BD desarrolló un software específico para citómetro de flujo que puede seleccionar los voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT, por su sigla en inglés) y la compensación de la fluorescencia, verificar la sensibilidad y el desempeño del instrumento o realizar el control diario de calidad. BD también desarrolló un software que calcula automáticamente los recuentos absolutos cuando se utilizan tubos BD Trucount. Sin embargo, se pueden utilizar otros paquetes de software de otros fabricantes que no sean BD para la adquisición y el análisis de datos; los recuentos absolutos se pueden calcular manualmente. Recomendamos los sistemas BD de la Tabla 1 para realizar la calibración del citómetro, la adquisición y el análisis. Consultar las instrucciones de uso (IU) del reactivo, el citómetro o el software para conocer más detalles.

Los resultados se pueden alcanzar con otras plataformas. El citómetro de flujo debe estar equipado con equipos láser de 635 nm y de 488 nm y debe poder detectar la dispersión de la luz (frontal y lateral [FSC y SSC, respectivamente]) y la fluorescencia de cuatro colores con una emisión que se pueda detectar en cuatro rangos:

- 515–545 nm
- 562–607 nm
- >650 nm
- 652–668 nm

El citómetro de flujo debe poder generar un umbral o discriminar con el canal >650-nm. Los usuarios de citómetros de flujo fabricados por otras

empresas que no sean BD deben consultar las instrucciones del fabricante para calibrar la inmunofenotipificación con cuatro colores.

Con este producto se pueden utilizar los cargadores BD FACS™ Loader y BD FACS™ Universal Loader.

Asegúrese de que el instrumento esté bien calibrado y realice controles diarios de calidad antes de usarlo.

Tabla 1 Sistemas BD recomendados

Citometría de flujo	Microesferas de calibración	Software de configuración	Software de análisis
BD FACSLytic™	Microesferas CS&T de BD™ Kit de microesferas de 7 colores BD™ para citometría de flujo	Software clínico BD FACSuite™	Software clínico BD FACSuite™
BD FACSCanto™ BD FACSCanto™ II	Microesferas de calibración de 7 colores BD FACS™	Software clínico BD FACSCanto™	Software clínico BD FACSCanto™
BD FACSCalibur™	Kit de 3 colores BD Calibrite™ Microesferas APC BD Calibrite™	Software BD FACSComp™ v4.0 o posterior	BD Multiset™ software

6. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recolecte la sangre de manera aséptica por venopunción^{31,32} en un tubo para recolección de sangre EDTA Vacutainer® EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) o equivalente. El reactivo BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 y los tubos BD Trucount se validaron con fórmulas líquidas y deshidratadas de EDTA.

Para este procedimiento se necesita como mínimo 100 µL de sangre entera.

Siga las pautas del fabricante del tubo de recolección para el volumen mínimo de sangre que se recolectará para garantizar la dilución

adecuada de la muestra, en especial cuando se obtienen los recuentos absolutos con los tubos BD Trucount.

Obtenga un recuento de glóbulos blancos y un recuento diferencial de glóbulos blancos con la misma muestra de sangre entera, antes de la tinción, para garantizar que el recuento de glóbulos blancos esté dentro del rango lineal para el instrumento correspondiente, o calcule los recuentos absolutos a partir de los porcentajes.

La sangre anticoagulada conservada a temperatura ambiente (20°C–25°C) se debe tincionar dentro de las 48 horas de la extracción; se debe analizar dentro de las 24 horas posteriores a la tinción.

Condiciones de interferencia

No use muestras del paciente previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre entera refrigeradas antes de la tinción pueden arrojar resultados anormales. Las muestras de pacientes inmunodeprimidos pueden alcanzar una resolución de baja calidad³³ Los blastocitos pueden interferir con los resultados de los ensayos. Las muestras hemolizadas se deben rechazar.

7. REACTIVOS Y MATERIALES

Reactivo suministrado

El reactivo, suficiente para 50 ensayos cuando se usa según las indicaciones, se entrega en 1 mL de solución salina tamponada con ázida sódica (0,1%).

- BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 (Número de catálogo 340500), o
- BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 con tubos BD Trucount (Número de catálogo 340492)

Los tubos BD Trucount contienen un pellet congelado en seco de microesferas fluorescentes en un tubo de uso único. Cada bolsa BD Trucount contiene 25 tubos, suficientes para 25 ensayos. El kit se entrega con dos bolsas en el kit.

Reactivos y materiales requeridos pero que no se suministran

- Para citómetros de flujo BD FACSLyric:
Microesferas CS&T de BD (Números de catálogo 662413, 662414)
Microesferas de calibración BD FC de 7 colores (Número de catálogo 662961)
- Para los citómetros de flujo BD FACSCanto y BD FACSCanto II:
Microesferas de calibración BD FACS de 7 colores (Catálogo número 335775)
- Para citómetros de flujo BD FACSCalibur:
Kit de 3 colores BD Calibrite y microesferas APC BD Calibrite (Números de catálogo. 340486 y 340487, respectivamente)
- Solución lisante BD FACS™(Número de catálogo 349202)
Consultar las instrucciones de uso (IU) de la solución lisante BD FACS™ para conocer las precauciones y advertencias.
- Agua de grado reactivo (destilada o desmineralizada)
- Líquido envolvente BD FACSFlow™ (número de catálogo 342003) o equivalente

CUIDADO Use solo el líquido envolvente BD FACSFlow para diluir las microesferas de 3 colores BD Calibrite, las microesferas APC BD Calibrite y las microesferas CS&T de BD.

NOTA Use solo la solución tamponada para dilución de las microesferas BD™ para citometría de flujo, para reconstituir las esferas.

- Tubos para recolección de sangre BD Vacutainer EDTA o equivalentes
- Tubos descartables para ensayos Falcon®* de polistireno con tapa, 12 x 75 mm o equivalentes (si no se utilizan los tubos BD Trucount)
- Agitador vorticial
- Micropipeteador con puntas
- Dispensador a granel o pipeta (450 µL) para administrar solución lisante 1X BD FACS
- Control del proceso de lisado de la sangre entera, por ejemplo:

- Control BD Multi-Check (Números de catálogo 349700, 349701, 349702)
- Control basal de CD4 BD™ Multi-Check (números de catálogo 349703, 349704, 349705)

NOTA Recomendamos realizar los controles de BD Trucount™ (Número de catálogo 340335) para verificar la técnica de pipeteo. Los controles son compatibles con el sistema BD FACSCalibur. No usar los controles BD Trucount con el software clínico BD FACSCanto. Las microesferas de control BD Trucount pueden interferir con los resultados de los recuentos absolutos.

* Falcon es marca registrada de Corning Incorporated.

8. INSTRUCCIONES DE USO

Dilución de la solución lisante BD FACS

Diluir el concentrado 10 X 1:10 con agua desmineralizada a temperatura ambiente (20°C–25°C). La solución preparada es estable durante 1 mes cuando se conserva en un recipiente de vidrio o de polietileno de alta densidad (HDPE, por su sigla en inglés) a temperatura ambiente.

Técnica de pipeteo inverso

Es fundamental ser exacto en el manejo de la pipeta cuando se usa un tubo BD Trucount. Recomendamos la técnica de pipeteo inverso para colocar la muestra en un tubo BD Trucount. Para el pipeteo inverso, presione el botón hasta el segundo tope. Suelte el botón para que el exceso de muestra vaya a la punta.

Presione el botón hasta el primer tope para descargar el volumen exacto de muestra; el exceso queda en la punta.

Control de calidad

De acuerdo con las pautas del Instituto Estadounidense de Patólogos (*College of American Pathologists, CAP*, por su sigla en inglés), recomendamos correr dos niveles de material de control líquido (control del proceso). Los controles se deben correr al

menos una vez por día en que se realizan ensayos en los pacientes.³⁵

Use controles comerciales con valores establecidos para porcentajes positivos y recuentos absolutos en cada corrida para evaluar el desempeño del sistema. BD suministra el control BD Multi-Check y el control basal de CD4 BD Multi-Check para controlar los procesos.

Para realizar el control de calidad:

1. Mezclar bien el control BD Multi-Check correspondiente o el proceso de control equivalente.

Consultar las IU para controlar las instrucciones detalladas.

2. Tincionar la muestra de control con BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 según se describe en la siguiente sección.

La muestra de control se debe procesar como las muestras de los pacientes para controlar el desempeño constante de todo el proceso analítico.

3. Adquirir la muestra de control tincionada en el citómetro de flujo.
4. Inspeccione visualmente CD45 en el gráfico de puntos SSC.

La población de linfocitos debe aparecer como un grupo compacto y brillante con una SSC baja. Los monocitos y los granulocitos deben también aparecer como grupos o clústeres separados. No siga con el análisis si las poblaciones son difusas o si la separación entre grupos es poca o inexistente.

5. Verifique que los resultados se encuentren dentro de los valores informados en la planilla de Valores del ensayo.

Tinción de las células

Proteja los tubos de la luz directa. Realizar el procedimiento a temperatura ambiente (20°C– 25°C). Consulte las Precauciones y las condiciones de interferencia.

1. Rotule los tubos de 12 x 75 mm con la muestra de cada paciente con el número de identificación de la muestra.

Para los conteos absolutos, rotule un tubo BD Trucount en lugar del tubo de 12 x 75mm.

NOTA Antes de usar, verificar que el pellet de la microesfera en los tubos BD Trucount esté intacto y dentro del retenedor de metal en el fondo del tubo. Caso contrario, descarte el tubo BD Trucount y reemplácelo por otro.

2. Cargar con la pipeta 20 μ L de BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 en el fondo del tubo. Si usa un tubo BD Trucount, descargue el reactivo con la pipeta en la pared del tubo, justo por encima del retenedor de metal, sin tocar el pellet de la microesfera.
3. Colocar con la pipeta 50 μ L de sangre entera anticoagulada bien mezclada en el fondo del tubo.

NOTA Si usa un tubo BD Trucount, recomendamos usar la técnica de pipeteo inverso para colocar la muestra en la pared del tubo justo por encima del retenedor. Evite manchar con sangre la pared del tubo. Si la sangre entera permanece en la pared del tubo, no se tincionará con el reactivo y esto puede afectar los resultados.

4. Tapar el tubo y agitar con cuidado para mezclar.
5. Incubar durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20°C–25°C).
6. Agregar 450 μ L de solución lisante BD FACS 1X al tubo.
7. Tapar el tubo y agitar con cuidado para mezclar.
8. Incubar durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20°C–25°C).

La muestra está lista para el análisis en el citómetro de flujo. Si las muestras no se analizan de inmediato luego de la tinción, consérvelas lejos de la luz a temperatura ambiente (20°C–25°C).

Adquisición de las muestras

1. Agitar bien las células a baja velocidad.

Es importante reducir la aglutinación antes de correr las muestras en el citómetro de flujo.³⁴

NOTA Si usa un cargador (Loader), agite los tubos inmediatamente antes de colocarlos en las gradillas del cargador.

2. Colocar el tubo en el citómetro y realizar la adquisición de la muestra.

Antes de adquirir las muestras, ajustar el umbral para minimizar los sedimentos y garantizar que queden incluidas las poblaciones de interés.

3. Analizar los datos con el software específico del citómetro.

Consultar las IU del citómetro para obtener más información.

9. RESULTADOS

Los resultados se informan como el porcentaje de células positivas por población de linfocitos o la cantidad de células positivas por microlitro de sangre (recuento absoluto).

Cálculo de los recuentos absolutos

Durante el análisis, la cantidad absoluta (células/ μ L) de células positivas en la muestra se puede determinar mediante la comparación de los eventos con células y los eventos con microesferas. Si se utilizan los paquetes de software BD FACSuite Clinical, BD FACSCanto Clinical o BD Multiset, los recuentos absolutos se determinarán con software.

Para analizar los datos en forma manual, use el software BD CellQuest™ Pro u otro. El recuento absoluto de la población de células (A) se puede calcular con la siguiente ecuación:

$A = X/Y \times N/V$, donde:

X es la cantidad de eventos celulares positivos

Y es la cantidad de eventos con microesferas

N es la cantidad de microesferas por ensayo, que se encuentra en el envase con los tubos BD Trucount y puede variar entre lotes

V es el volumen de la muestra (50 μ L)

Datos representativos

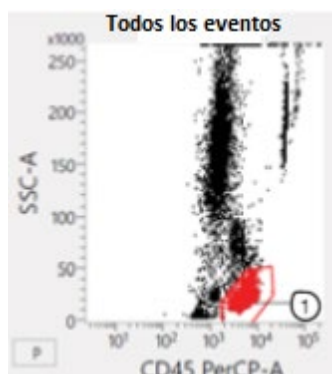
Citómetro de flujo BD FACSLyric

Se adquirió una muestra de un adulto, hematológicamente normal, tincionada con BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 en un tubo BD Trucount con un citómetro BD FACSLytic. Consulte la Figura 1. El panel A muestra los linfocitos CD45+ identificados en CD45 PerCP-A en el gráfico de puntos de SSC-A. El panel B muestra los eventos de microesferas en los recuentos absolutos en los tubos BD Trucount (2) en CD19 APC-A en el gráfico de puntos SSC-A.

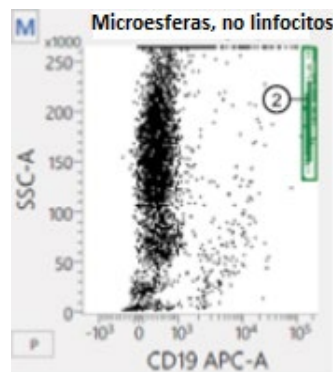
El panel C muestra los linfocitos T CD3+ en CD3 FITC-A en el gráfico de puntos SSC-A. El panel D muestra los linfocitos B (CD19+) y los linfocitos NK (CD16 y 56+) en CD16 +56 PE-A en el gráfico de puntos CD19 APC-A.

Figura 1 Datos representativos de una muestra de un individuo adulto, hematológicamente normal, tincionada con BD Multitest CD3/ CD16+ CD16/CD45/CD19 en un tubo BD Trucount (BD FACSLytic)

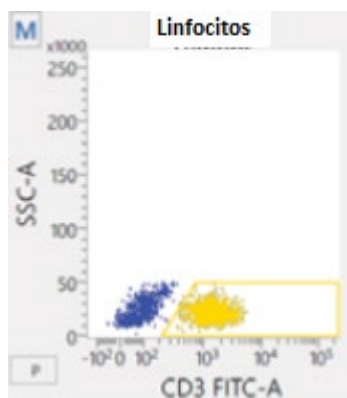
A



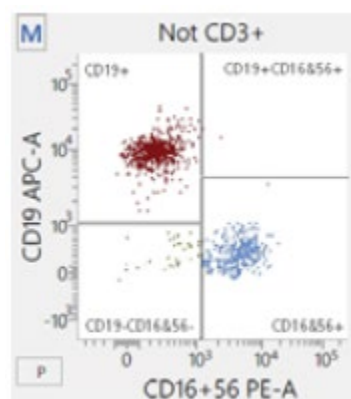
B



C



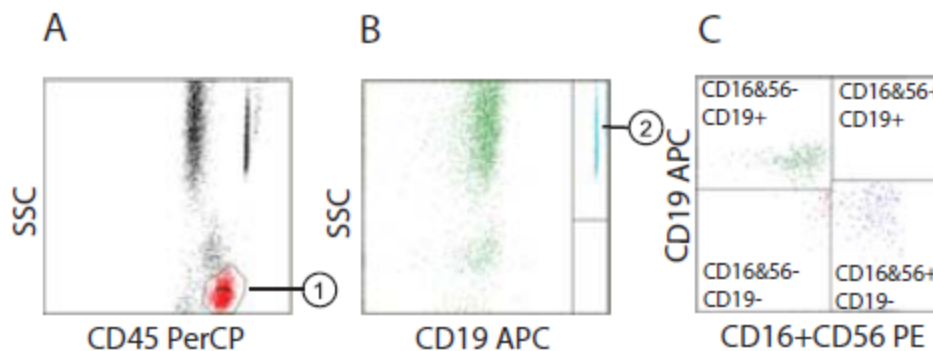
D



Citómetro de flujo BD FACSCanto II

Se adquirió una muestra de un individuo adulto, hematológicamente normal, tincionada con BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 en un tubo BD Trucount con el citómetro de flujo BD FACS FACSCanto II. Consulte la Figura 2. El panel A muestra los linfocitos CD45+ (1) identificados en CD45 PerCP en el gráfico de puntos de SSC. El panel B muestra los eventos de microesferas para recuento absoluto en los tubos BD Trucount (2) en CD19 APC en el gráfico de puntos de SSC. El panel C muestra los linfocitos B (CD16y56–CD19+) y los linfocitos NK (CD16y56+CD19–) en CD16 +56 PE en el gráfico de puntos CD19 APC.

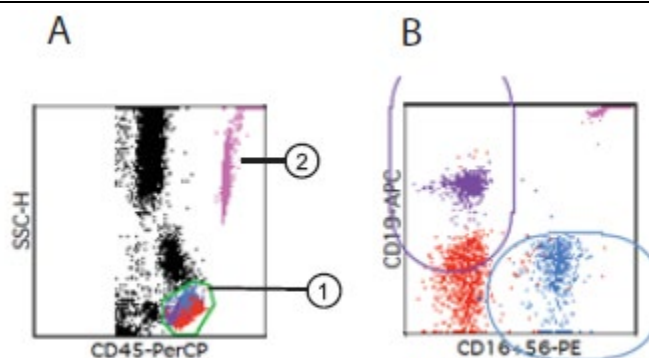
Figura 2 Datos representativos de una muestra de un individuo adulto, hematológicamente normal, tincionada con BD Multitest CD3/ CD16+ CD16/CD45/CD19 en un tubo BD Trucount (BD FACSCanto II)



Citómetro de flujo BD FACSCalibur

Se adquirió una muestra de un individuo adulto, hematológicamente normal, tincionada con BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 en un tubo BD Trucount con el citómetro de flujo BD FACS FACSCalibur II. Consulte la Figura 3. El panel A muestra los linfocitos CD45+ (1) y los eventos de microesferas en los recuentos absolutos en los tubos BD Trucount (2) en CD45 PerCP en el gráfico de puntos de SSC. El panel B muestra los linfocitos B (CD19+) y los linfocitos NK (CD16+, CD56+ o ambos) identificados en CD16+ CD56 PE en el gráfico de puntos CD19 APC.

Figura 3 Datos representativos de una muestra de un individuo adulto, hematológicamente normal, tincionada con BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 en un tubo BD Trucount (BD FACSCalibur)



10. LIMITACIONES

- Los laboratorios deben establecer sus propios intervalos normales de referencia para los parámetros de BD Multitest CD3/ CD16+CD56/CD45/CD19 que pueden ser afectados por el sexo y la edad del paciente y la técnica de preparación. El origen racial del paciente puede también tener un efecto,³⁶ si bien no existen suficientes datos para determinarlo. Se deben conocer la edad, el sexo, las características clínicas y el origen racial de los pacientes cuando se determina un intervalo de referencia determinada.³⁷ Los intervalos de referencia se suministran solo con fines informativos.
- No se validó el uso de BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 con los anticoagulantes de heparina líquida o solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD) para realizar los recuentos absolutos con los tubos BD Trucount.
- El reactivo BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 no ha sido diseñado para evaluar muestras para la detección de células leucémicas para uso en la fenotipificación de muestras de pacientes con leucemia.
- Los recuentos absolutos no se pueden comparar entre laboratorios que usan equipos de fabricantes distintos.

11. VALORES PREVISTOS

Se establecieron los intervalos de referencia para BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 con y sin los tubos BD Trucount.³⁷ Para establecer los intervalos de referencia para el citómetro de flujo BD FACSLytic, se incluyeron en el estudio individuos adultos

hematológicamente normales de entre 19 y más de 80 años de edad. Los estudios para otros instrumentos se realizaron en distintos momentos con muestras de distintas poblaciones, lo que puede contribuir a las diferencias en los intervalos de referencia entre los instrumentos.

Consulte la primera limitación en la sección anterior para obtener más información sobre los intervalos de referencia.

Citómetro de flujo BD FACSLyric

Tabla 2 Intervalos de referencia representativos para BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19

Población de linfocitos	N ^a	Unidades	Media	Rango del 95%
CD3+	130	%	71,77	56,74– 82,54
		células/ μ L	1560,44	812– 2.655
CD3–CD19+	130	%	13,69	5,14– 22,96
		células/ μ L	292,73	60– 551
CD3–(CD16+C56)+	130	%	13,25	5,42– 29,65
		células/ μ L	281,04	102– 617

a. N = cantidad de muestras

† Las edades de los individuos oscilaron entre los 18 y los 65 años de edad en los estudios para establecer los intervalos de referencia para los citómetros de flujo BD FACSCanto II, BD FACSCanto y BD FACSCalibur.

Citómetros de flujo FACSCanto II, BD FACSCanto y BD FACSCalibur

Tabla 3 Intervalos de referencia representativos para BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19

Población de linfocitos	de	Na	Unidades	Media	Rango del 95%
CD3+		164	%	72	56– 86
			células/ μ L	1507	754– 2.764
CD3–CD19+		164	%	14	5– 22

340500 IU ESP - 20

		células/ μ L	293	80– 616
CD3–(CD16+C56)+	164	%	13	5– 26
		células/ μ L	267	84– 724

12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

Citómetro de flujo BD FACSLyric

Método de comparación (Citómetro de flujo BD FACSLyric)

Los porcentajes para las poblaciones de linfocitos y los recuentos absolutos se calcularon con BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 en los tubos BD Trucount y se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSLyric con el software clínico BD FACSuite versión 1.0. Los resultados se compararon con resultados de reactivos analizados con el citómetro de flujo BD FACSCanto con el software clínico BD FACSCanto, versión 2.4 o posterior.

Las muestras de sangre entera se recolectaron en forma aleatoria en cinco centros de estudios clínicos. Se informan estadísticas de comparación de métodos para todos los subgrupos celulares.³⁸ Consultar Tabla 4.


Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

Tabla 4 Método de comparación con estadísticas para las poblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población	N	Unidades	R ²	Pendiente	Intersección	Rango
CD3+	336	%	0,99	1,00	0,44	1,38– 96,74
		células/μL	0,99	1,04	-0,58	6– 6.445
CD3–CD19+	336	%	1,00	1,02	-0,24	0,00– 92,43
		células/μL	1,00	1,02	-0,16	0– 2.770
CD3–(CD16+C56)+	336	%	0,99	1,00	-0,85	1,51– 87,67
		células/μL	0,99	0,96	-3,95	14– 1.502

Precisión dentro del laboratorio (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Se realizó un estudio de 21 días en el laboratorio de BD Biosciences para evaluar la precisión dentro del laboratorio.⁴⁵ Las estimaciones de precisión para los porcentajes y los recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos se realizaron en los cuatro citómetros de flujo BD FACSLytic, con cuatro operadores, mediante la adquisición de cuatro concentraciones de analitos CD-Chex Plus® ‡ CD4 Low control y CD-Chex Plus® control, tincionados por duplicado con cuatro lotes de BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19. Se analizaron dos corridas distintas durante cada uno de los 21 días de ensayos para un total de 42 corridas.

Las siguientes tablas presentan los desvíos estándar (DE) y los coeficientes de variación (CV) para la precisión y la repetibilidad dentro del laboratorio de los porcentajes y recuentos absolutos de poblaciones de linfocitos, respectivamente.

‡ CD-Chex Plus es marca registrada de Streck, Inc.


 Karina Valeria Traverso
 Co-Directora Técnica / Apoderada
 M.N. 14.733 - M.P. 20.293
 Becton Dickinson Argentina SRL

Tabla 5 Precisión dentro del laboratorio de los porcentajes de poblaciones de linfocitos en concentraciones bajas de analitos (CDL^a) (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población linfocitos	de	Media (%)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+		57,20	1,09	1,17
CD3-CD19+		21,70	0,79	0,82
CD3-(CD16+C56)+		19,40	0,84	0,85

a. CDL = CD-Chex Plus CD4 Low control

Tabla 6 Precisión dentro del laboratorio de los porcentajes de poblaciones de linfocitos en concentraciones normales de analitos (CDN^a) (Citómetro de flujo BD FACSLytic) Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población linfocitos	de	Media (%)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+		76,73	0,80	0,84
CD3-CD19+		12,09	0,55	0,55
CD3-(CD16+C56)+		10,34	0,59	0,59

a. CDN = CD-Chex Plus control

Tabla 7 Precisión dentro del laboratorio de los porcentajes de poblaciones de linfocitos en concentraciones bajas de analitos (CDL) (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población linfocitos	de	Media (células/ μ L)	%CV (Repetibilidad)	% CV (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+		871,97	3,82	3,97
CD3-CD19+		330,87	5,22	5,35
CD3-(CD16+C56)+		295,88	6,03	6,21

Tabla 8 Precisión dentro del laboratorio de los porcentajes de poblaciones de linfocitos en

concentraciones normales de analitos (CDN) (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	Media (células/ μ L)	%CV (Repetibilidad)	% CV (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+	1738,01	4,00	4,12
CD3-CD19+	273,84	6,02	6,16
CD3-(CD16+C56)+	234,38	7,41	7,52

Reproducibilidad entre laboratorios (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Se realizó un estudio para evaluar la reproducibilidad entre laboratorios. Se entregó un lote individual de cada control de proceso, CD-Chex Plus CD4 Low control y de CD-Chex Plus control, para cada uno de los cuatro laboratorios clínicos. Las muestras de control se tincionaron con reactivo BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19. Se analizaron dos corridas distintas durante cada uno de los 5 días de prueba no consecutivos para un total de 10 corridas.

Las siguientes tablas presentan los desvíos estándar (DE) y los coeficientes de variación (CV) para la reproducibilidad (precisión total) de los porcentajes y los recuentos absolutos de poblaciones de linfocitos, respectivamente.

Tabla 9 Reproducibilidad entre laboratorios de los porcentajes de las poblaciones de linfocitos en concentraciones bajas de analitos (CDL) (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	Media (%)	DE
CD3+	57,10	1,30
CD3-CD19+	21,74	0,83
CD3-(CD16+C56)+	19,44	1,06

Tabla 10 Reproducibilidad entre laboratorios de los porcentajes de las poblaciones de linfocitos en concentraciones normales de analitos (CDN) (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	de	Media (%)	DE
CD3+		76,84	1,05
CD3-CD19+		12,02	0,66
CD3-(CD16+C56)+		10,30	0,62

Tabla 11 Reproducibilidad entre laboratorios de los recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos en concentraciones bajas de analitos (CDL) (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	Media (células/ μ L)	%CV
CD3+	884,57	4,82
CD3-CD19+	336,79	5,71
CD3-(CD16+C56)+	301,25	7,40

Tabla 12 Reproducibilidad entre laboratorios de los recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos en concentraciones normales de analitos (CDN) (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Población de linfocitos	de	Media (células/ μ L)	%CV
CD3+		1748,31	4,80
CD3-CD19+		273,58	7,23
CD3-(CD16+C56)+		234,28	7,50

Repetibilidad de la sangre entera (Citómetro de flujo BD FACSLytic)

Se realizó un estudio de repetibilidad de sangre entera para demostrar la repetibilidad del sistema en 53 muestras de donantes.

Cada muestra de donante se tincionó por duplicado con el reactivo BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 en los tubos BD Trucount y se corrieron en 12 instrumentos; se realizó un total de 24 corridas por muestra.

Tabla 13 Repetibilidad de la sangre entera en las poblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLyric)

Población linfocitos	de	Media (%)	Repetibilidad dentro de la corrida (DE)	Repetibilidad total (DE)
CD3+		73,64	0,97	0,97
CD3-CD19+		13,02	0,67	0,67
CD3-(CD16+C56)+		12,37	0,71	0,71

Tabla 14 Repetibilidad de la sangre entera en los recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLyric)

Población linfocitos	de	Media (células/ μ L)	%CV (Repetibilidad)	% CV (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+		1396,78	4,17	4,26
CD3-CD19+		229,21	7,32	7,47
CD3-(CD16+C56)+		215,01	7,84	7,94

Estabilidad (Citómetro de flujo BD FACSLyric)

La estabilidad del reactivo BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 en los tubos BD Trucount se analizó mediante el estudio de:

- Los cambios asociados con la conservación de la sangre entera antes de la tinción
- Los cambios producidos por el tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de datos
- El efecto combinado de los dos

Las muestras de sangre entera se sometieron a ensayos hasta 51 horas luego de la extracción. Se realizaron ensayos en las muestras tincionadas hasta 26 horas luego de la tinción. Todas

las muestras se conservaron a temperatura ambiente (20°C–25°C) antes de la tinción o adquisición.

Sobre la base de los resultados de este estudio, recomendamos tincionar las muestras dentro de las 48 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 24 horas de la tinción.

Linealidad (Citómetro de flujo BD FACSLyric)

Se evaluó la linealidad para el citómetro de flujo BD FACSLyric con mediciones por triplicado de 11 concentraciones igualmente espaciadas de glóbulos blancos.

Se observó que las poblaciones de linfocitos fueran lineales en los siguientes rangos. Ver la tabla 15.

Tabla 15 Rangos lineales de las poblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLyric)

Población de linfocitos	Rango (células/ μ L)
CD3+	8– 5.215
CD3–CD19+	1– 1.008
CD3–(CD16+C56)+	2– 1.396

Rango de medición analítica (Citómetro de flujo BD FACSLyric)

Se estableció el rango de medición analítica (AMR) para BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/ CD45/CD19 en el citómetro de flujo BD FACSLyric. Se determinó el límite inferior del AMR a partir del estudio del límite de cuantificación (LoQ); el límite superior del AMR se determinó con el estudio de comparación de métodos.

Tabla 16 Rechazo mediado por anticuerpos (AMR) de las poblaciones de linfocitos (citómetro de flujo BD FACSLyric)

Población de linfocitos	Rango (células/ μ L)
CD3+	14– 5.000
CD3–CD19+	14– 2.000
CD3–(CD16+C56)+	10– 1.200

Citómetro de flujo BD FACSCanto II

Método de comparación (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)

Los porcentajes para las poblaciones de linfocitos y los recuentos absolutos se calcularon con BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 en los tubos BD Trucount y se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSCanto II con el software clínico BD FACSCanto versión 2.1. Los resultados se compararon con resultados obtenidos del reactivo analizado con el citómetro de flujo BD FACSCanto con el software clínico BD FACSCanto, versión 2.0.

Las muestras de sangre entera se recolectaron en forma aleatoria en un laboratorio clínico. Las estadísticas de regresión se informan en la Tabla 17.

Tabla 17 Análisis de regresión para los porcentajes y los recuentos absolutos de la población (citómetro de flujo BD FACSCanto II)

Población	N	Unidades	R ²	Pendiente	Intersección	Rango
CD3+	104	%	0,984	0,97	2,72	52-92
		células/μL	0,991	0,97	27,59	221-3.873
CD3-CD19+	104	%	0,986	0,97	0,32	0-38
		células/μL	0,979	0,97	2,37	0-834
CD3-(CD16+CD56)+	104	%	0,957	0,93	0,19	2-32
		células/μL	0,961	0,88	10,56	20-606

Precisión (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)

Se realizaron estimaciones de precisión en el laboratorio de BD Biosciences en dos muestras que se corrieron por duplicado con dos niveles distintos de concentración de analitos. Las muestras se corrieron en tres instrumentos distintos con tres operadores distintos (un operador y un instrumento por día).

Se analizaron dos corridas distintas durante cada uno de los 21 días de prueba para un total de 42 corridas. La calibración se realizó con microesferas de 7 colores BD FACS antes de cada corrida, para un total

de 42 corridas. Se utilizaron un lote de reactivos y un lote de calibradores durante la duración del estudio.

Las siguientes tablas presentan los desvíos (DE) y los coeficientes de variación (%CV) para la precisión y la repetibilidad dentro del dispositivo de los porcentajes y los recuentos absolutos de poblaciones de linfocitos, respectivamente.

Tabla 18 Precisión de los porcentajes de poblaciones de linfocitos en concentraciones bajas de analitos (CDL^a) (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)

Población linfocitos	de	Media (%)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+		54,1	0,96	0,98
CD3-CD19+		26,1	0,86	0,86
CD3-(CD16+C56)+		18,2	0,87	0,87

a. CDL = CD-Chex Plus CD4 Low control

Tabla 19 Precisión de los porcentajes de poblaciones de linfocitos en concentraciones normales de analitos (CDC^a) (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)

Población linfocitos	de	Media (%)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+		73,0	0,63	0,67
CD3-CD19+		15,4	0,54	0,56
CD3-(CD16+C56)+		10,6	0,51	0,52

a. CDC = CD-Chex Plus control


 Karina Valeria Traverso
 Co-Directora Técnica / Apoderada
 M.N. 14.733 - M.P. 20.293
 Becton Dickinson Argentina SRL

Tabla 20 Precisión de los recuentos absolutos en concentraciones bajas de analitos (CDL) (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)

Población linfocitos de	Media (células/ μ L)	%CV (Repetibilidad)	% CV (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+	1086,0	3,5	3,6
CD3-CD19+	526,1	6,2	6,4
CD3-(CD16+C56)+	376,1	5,9	6,1

Tabla 21 Precisión de los recuentos absolutos en concentraciones normales de analitos (CDC) (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)

Población linfocitos de	Media (células/ μ L)	%CV (Repetibilidad)	% CV (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+	2105,4	2,7	2,9
CD3-CD19+	443,5	5,5	5,6
CD3-(CD16+C56)+	306,3	6,0	6,0

Estabilidad (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)

La estabilidad del reactivo BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 en los tubos BD Trucount se analizó mediante el estudio de:

- Los cambios asociados con la conservación de la sangre entera antes de la tinción
- Los cambios producidos por el tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de datos
- El efecto combinado de los dos

Las muestras de sangre entera se sometieron a ensayos hasta 48 horas luego de la extracción. Se realizaron ensayos en las muestras tincionadas hasta 24 horas luego de la tinción. Todas las muestras se conservaron a temperatura ambiente (20°C–25°C) antes de la tinción o adquisición.

Sobre la base de los resultados de este estudio, recomendamos tincionar las muestras dentro de las 48 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 24 horas de la tinción.

Linealidad (Citómetro de flujo BD FACSCanto II)

Se evaluó la linealidad para el sistema BD FACSCanto II con un rango de glóbulos blancos de 0 a $3,3 \times 10^4$ glóbulos blancos/ μL . Se observó que los resultados fueron lineales en los siguientes rangos (Tabla 22).

Tabla 22 Linealidad del sistema BD FACSCanto

Población de linfocitos	Rango (células/ μL)
CD3+	6– 5.998
CD3–CD19+	1– 857
CD3–(CD16+C56)+	1– 447

Citómetro de flujo BD FACSCanto

Método de comparación (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Los porcentajes para las poblaciones de linfocitos y los recuentos absolutos se calcularon con BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 en los tubos BD Trucount y se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSCanto con el software clínico BD FACSCanto versión 2.0. Los resultados se compararon con los resultados de los reactivos analizados con el citómetro de flujo BD FACSCanto con el software BD Multiset.

Las muestras de sangre entera se recolectaron en forma aleatoria en un laboratorio clínico. Las estadísticas de regresión se informan en la Tabla 23.

Tabla 23 Análisis de regresión para los porcentajes y los recuentos absolutos de la población (citómetro de flujo BD FACSCanto)

Población	N	Unidades	R ²	Pendiente	Intersección	Rango
CD3+	108	%	0,993	1,00	-0,17	40-93
		células/ μL	0,987	0,99	-6,27	75-5.257

Población	N	Unidades	R ²	Pendiente	Intersección	Rango
CD3-CD19+	108	%	0,994	0,99	-0,05	0-42
		células/ μ L	0,990	1,02	-7,93	0-2.527
CD3-(CD16+CD56)+	108	%	0,989	1,00	0,39	2-45
		células/ μ L	0,981	0,95	10,80	11-1.374

Precisión (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Se realizaron estimaciones de precisión en el laboratorio de BD Biosciences en dos muestras que se corrieron por duplicado con dos niveles distintos de concentración de analitos. Las muestras se corrieron en tres instrumentos distintos con tres operadores distintos (un operador y un instrumento por día).

Se analizaron dos corridas distintas durante cada uno de los 20 días de prueba para un total de 40 corridas. La calibración se realizó con microesferas de 7 colores BD FACS antes de cada corrida, para un total de 40 corridas. Se utilizaron un lote de reactivos y un lote de calibradores durante la duración del estudio.

Las siguientes tablas presentan los desvíos (DE) y los coeficientes de variación (%CV) para la precisión y la repetibilidad dentro del dispositivo de los porcentajes y los recuentos absolutos de poblaciones de linfocitos, respectivamente.

Tabla 24 Precisión de los porcentajes de las poblaciones de linfocitos en concentraciones bajas de analitos (MCL^a) (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Población linfocitos	de	Media (%)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+		57,5	1,16	1,22
CD3-CD19+		20,5	0,70	1,05
CD3-(CD16+C56)+		18,6	1,03	1,14

a. MCL = BD Multi-Check CD4 Low control

Tabla 25 Precisión de los porcentajes de las poblaciones de linfocitos en concentraciones normales de analitos (MCN^a) (Citómetro de flujo FACSCanto)

Población de linfocitos	Media (%)	DE (Repetibilidad)	DE (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+	69,9	1,15	1,21
CD3-CD19+	13,6	0,68	0,77
CD3-(CD16+C56)+	13,7	0,89	1,03

a. MCN = BD Multi-Check control

Tabla 26 Precisión de los recuentos absolutos en concentraciones bajas de analitos (MCL) (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Población de linfocitos	Media (células/ μ L)	%CV (Repetibilidad)	% CV (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+	307,4	3,2	4,1
CD3-CD19+	108,5	4,9	7,1
CD3-(CD16+C56)+	98,6	6,6	8,2

Tabla 27 Precisión de los recuentos absolutos en concentraciones normales de analitos (MCN) (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Población de linfocitos	Media (células/ μ L)	%CV (Repetibilidad)	% CV (Precisión dentro del dispositivo)
CD3+	743,9	3,9	4,8
CD3-CD19+	143,3	7,0	7,8
CD3-(CD16+C56)+	145,0	8,0	9,9

Estabilidad (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

La estabilidad del reactivo BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 en los tubos BD Trucount se analizó mediante el estudio de:

- Los cambios asociados con la conservación de la sangre entera antes de la tinción
- Los cambios producidos por el tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de datos

- El efecto combinado de los dos

Las muestras de sangre entera se sometieron a pruebas hasta 48 horas luego de la extracción. Se realizaron pruebas en las muestras tincionadas hasta 24 horas luego de la tinción. Todas las muestras se conservaron a temperatura ambiente (20°C–25°C) antes de la tinción o adquisición.

Sobre la base de los resultados de este estudio, recomendamos tincionar las muestras dentro de las 48 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 24 horas de la tinción.

Linealidad (Citómetro de flujo BD FACSCanto)

Se evaluó la linealidad para el sistema BD FACSCanto con un rango de glóbulos blancos de 0 a $3,0 \times 10^4$ glóbulos blancos/ μL . Se observó que los resultados fueron lineales en los siguientes rangos (Tabla 28).

Tabla 28 Linealidad del sistema BD FACSCanto

Población	Rango (células/μL)
CD3+	48– 9,627
CD3–CD19+	5– 1,31
CD3–(CD16+C56)+	4– 671

Citómetro de flujo BD FACSCalibur

Método de comparación (Citómetro de flujo BD FACSCalibur)

Los porcentajes de las poblaciones de linfocitos y los recuentos absolutos realizados con BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 en los tubos BD Trucount se compararon con los resultados de BD Tritest™ CD3/CD16+CD56/CD45 o CD3/CD19/CD45 en los tubos BD Trucount.

Se recolectaron muestras de sangre entera, normales y anormales, en forma aleatoria en dos laboratorios clínicos y se evaluaron en ambos sistemas. El análisis de regresión de la Tabla 29 indica que los resultados son esencialmente equivalentes.

Tabla 29 Análisis de regresión para los porcentajes y los recuentos absolutos de la población (citómetro de flujo BD FACSCanto)

Población	N	Unidades	R	Pendiente	Intersección	Rango
CD3+	126	%	0,99	0,99	1,74	21,5-90
		células/ μ L	0,98	1,01	-10,18	100-2.883
CD3-CD19+	126	%	0,99	0,98	-0,25	0-59
		células/ μ L	0,98	0,95	1,77	3-877,6
CD3-(CD16+CD56)+	126	%	0,97	0,97	-0,85	3-40,0
		células/ μ L	0,96	0,92	-5,44	37-901

Reproducibilidad dentro de la muestra (Citómetro de flujo BD FACSCalibur)

Se realizaron estimaciones de reproducibilidad dentro de las muestras en tres laboratorios clínicos a partir de cinco réplicas de cada muestra normales y anormales recolectadas de donantes. Se suministraron las medias, los DE y los CV para los porcentajes y los recuentos absolutos de las poblaciones mayores a 100 células/ μ L en la Tabla 30 y la Tabla 31.

Tabla 30 Reproducibilidad dentro de la muestra de los porcentajes de la población (citómetro de flujo BD FACSCalibur)

Población	N	Media (%)	DE
CD3+	46	72,1	0,99
CD3-CD19+	46	15,6	0,71
CD3-(CD16+CD56)+	46	10,8	0,73

Tabla 31 Reproducibilidad dentro de la muestra de los recuentos absolutos (citómetro de flujo BD FACSCalibur)

Población	N	Media (células/ μ L)	%CV
CD3+	46	1217	4,7
CD3-CD19+	37	278	5,8
CD3-(CD16+CD56)+	33	217	8,3

Estabilidad (Citómetro de flujo BD FACSCalibur)

La estabilidad del reactivo BD Multitest CD3/ CD16+ CD56/CD45/CD19 en los tubos BD Trucount se analizó mediante el estudio de:

- Los cambios asociados con la conservación de la sangre entera antes de la tinción
- Los cambios producidos por el tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de datos
- El efecto combinado de los dos

Las muestras de sangre entera se sometieron a ensayos hasta 48 horas luego de la extracción. Se realizaron ensayos en las muestras tincionadas hasta 24 horas luego de la tinción. Todas las muestras se conservaron a temperatura ambiente (20°C–25°C) antes de la tinción o adquisición.

Sobre la base de los resultados de este estudio, recomendamos tincionar las muestras dentro de las 48 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 24 horas de la tinción.

Linealidad (Citómetro de flujo BD FACSCalibur)

Se evaluó la linealidad en una concentración de glóbulos blancos de $0,2 \times 10^3$ hasta $29,7 \times 10^3$ glóbulos blancos/ μL y una concentración de linfocitos de $0,1 \times 10^3$ hasta $9,0 \times 10^3$ linfocitos/ μL . Se observó que los resultados fueron lineales en el rango CD3–CD16+CD56, en el rango CD19+ y en el rango CD8+.

13. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Causa probable	Solución
La discriminación entre restos celulares y células es deficiente.	La muestra es de baja calidad.	Verificar la viabilidad.
	La muestra es demasiado antigua.	Obtener una nueva muestra y tincionarla sin demora.
La tinción es débil o tenue.	La concentración celular fue demasiado elevada en la etapa de tinción.	Verificar la concentración de células y ajustar según sea necesario.
	Las células tincionadas se conservaron demasiado	Repetir la tinción con una muestra nueva y adquirirla sin demora.

	tiempo antes de adquirirlas.	
Se registraron pocas células o ninguna.	La concentración celular es demasiado baja.	Volver a suspender una nueva muestra con una concentración más alta. Repetir la tinción y la adquisición.
	El citómetro funciona mal.	Resolver los problemas del instrumento Consultar las IU del citómetro para obtener más información.

GARANTÍA

Salvo indicación en contrario en cualquiera de las condiciones generales de venta de BD para los clientes fuera de los Estados Unidos, se aplica la siguiente garantía a la compra de estos productos.

SOLO SE GARANTIZA LA CANTIDAD Y EL CONTENIDO INDICADO EN EL RÓTULO DEL PRODUCTO AL MOMENTO DE LA ENTREGA AL CLIENTE. POR LA PRESENTE, BD DECLINA SU RESPONSABILIDAD POR TODAS LAS OTRAS GARANTÍAS, EXPRESAS O IMPLÍCITAS, QUE INCLUYEN LA GARANTÍA DE COMERCIALIZACIÓN O NO VIOLACIÓN O DE IDONEIDAD PARA UN USO DETERMINADO. LA RESPONSABILIDAD EXCLUSIVA DE BD SE LIMITA AL REEMPLAZO DE LOS PRODUCTOS O EL REEMBOLSO DEL PRECIO DE COMPRA. BD NO ES RESPONSABLE POR LOS DAÑOS A LA PROPIEDAD NI POR DAÑOS ESPECIALES O INDIRECTOS, INCLUIDAS LAS LESIONES PERSONALES O LAS PÉRDIDAS ECONÓMICAS CAUSADAS POR EL PRODUCTO.

REFERENCIAS

1. Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T y otros. Definición de las células natural killer. Editores: Ades E, Lopez C. Células natural killer y mecanismos de defensa del huésped. Basel: Karger; 1989:1.
2. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. La relación de la expresión del antígeno anti-CD16 (Leu-11) y Leu-19 (NKH-1) en las células NK humanas de sangre periférica y los linfocitos T citotóxicos. J Immunol. 1986; 136:4480-4486.

3. Schmidt RE. Anticuerpos monoclonales para diagnóstico de inmunodeficiencias. *Blut*. 1989; 59:200-206.
4. Nicholson JKA. Uso de la citometría de flujo en la evaluación y el diagnóstico de enfermedades de inmunodeficiencia primaria y secundaria. *Arch Pathol Lab Med*. 1989; 113:598-605.
5. Foucar K, Goeken JA. Aplicación clínica de las técnicas inmunológicas en el diagnóstico de trastornos linfoproliferativos y de inmunodeficiencia. *Laboratorio Médico*. 1982; 13:403-413.
6. Cohen SB, Weetman AP. Linfocitos intersticiales e intraepiteliales activados en la enfermedad autoinmune de tiroides. *Acta Endocrinol*. 1988; 119:161-166.
7. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneidad de las poblaciones de células T inmunoregulatorias en el lupus eritematoso sistémico; correlación con las características clínicas. *Am J Med*. 1982; 72:783-790.
8. Nicholson JKA, Jones BM, Hubbard M. Recuentos de linfocitos T con CD4 en muestras de sangre entera con un ensayo en un tubo individual con tres colores. *Citometría*. 1993; 14:685-689.
9. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Suplemento sobre los tres colores en las pautas NIAID DAIDS para inmunotipificación en la citometría de flujo. *Citometría*. 1996; 26:227-230.
10. Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Uso de la fluorescencia CD45 y de la dispersión lateral para separar linfocitos cuando se usa el procedimiento de lisado de la sangre entera y la citometría de flujo. *Citometría*. 1996; 26: 16- 21.
11. Haynes BF. Resumen de los estudios con células T realizado durante el Segundo Taller y Conferencia Internacional sobre Antígenos de Diferenciación en Leucocitos Humanos. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. *Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
12. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Las subunidades con unión no covalente de 22 y 28 kd son asimiladas rápidamente por las células T que reaccionan con el anticuerpo Anti-Leu-4. *J Immunol*. 1983; 131:536-539.

13. Knowles RW. Análisis inmunoquímico de los antígenos específicos para células T. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. *Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986; 259-288.
14. Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Células natural killer humanas analizadas con B73.1., un anticuerpo monoclonal que bloquea las funciones de los receptores Fc, I; caracterización de la población de linfocitos reactivo con B73.1. *J Immunol*. 1983; 130:2133-2141.
15. Perussia B, Acuto O, Terhorst C y otros. Células natural killer humanas analizadas con B73.1., un anticuerpo monoclonal que bloquea las funciones de los receptores Fc, II; estudios de la interacción anticuerpo-antígeno B73.1 en la membrana de los linfocitos. *J Immunol*. 1983; 130:2142-2148.
16. Schmidt RE. Informe sobre natural killer sin linaje: clusters nuevos y previamente definidos. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. *Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:517-542.
17. Ritz J, Trinchieri G, Lanier LL. Antígenos de las células NK: sección de informe. Editores: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W y otros. *Tipificación de leucocitos V: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos*. New York, NY: Oxford University Press; 1995:1367-1372.
18. Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Familia sin linaje, LFA-1 y antígenos comunes para leucocitos; clústeres nuevos y previamente definidos. Editores: McMichael AJ, ed. *Tipificación de leucocitos III: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
19. Nadler LM. Taller sobre el panel células B/leucemia: resumen y comentarios. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. *Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos B*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:3-43.
20. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM y otros. Expresión citoplasmática del antígeno anti-CD3 como marcador

- diagnóstico para neoplasias de células T inmaduras. *Sangre*. 1988; 71:603-612.
21. Brenner MB, McClean J, Dialynas DP y otros. Identificación de un segundo receptor putativo de células T. *Nature*. 1986; 322:145-149.
 22. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. El complejo e células T receptoras/CD3: un ensamble proteico dinámico. *Annu Rev Immunol*. 1988; 6:629-662.
 23. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A y otros. Receptor Fc para IgG en células natural killer humanas: estudios fenotípicos, funcionales y comparativos con anticuerpos monoclonales. *J Immunol*. 1984; 133:180-189.
 24. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Análisis molecular y funcional de la molécula de adhesión neural asociada con la célula natural killer humana (N-CAM/CD56). *J Immunol*. 1991; 146:4421-4426.
 25. Schubert J, Lanier LL, Schmidt RE. Informe del clúster: CD56. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.
 26. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Molécula de adhesión celular neural: estructura, dominios de tipo inmunoglobulina, modulación de la superficie celular y empalme alternativo del ARN. *Ciencia*. 1987; 236:799-806.
 27. Schwinzer R. Informe del clúster: CD45/CD45R. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
 28. Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. Antígenos de las células B: CD19. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:34-36.
 29. Centros para el Control de Enfermedades. Actualización sobre las perspectivas en la prevención de enfermedades y promoción de la

- salud: precauciones universales para la prevención en la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis B y otros patógenos de la sangre en entornos sanitarios. MMWR. 1988; 37:377-388.
30. Protección del personal de laboratorio de las infecciones adquiridas en el ámbito laboral; Pautas aprobadas — Cuarta edición. Villanova, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2014. Documento CLSI M29-A4.
 31. Procedimientos para la recolección de muestras de sangre con fines diagnósticos por venopunción: Estándar aprobado—Sexta edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2007. Documento CLSI H3-A6.
 32. Enumeración de poblaciones de células definidas inmunológicamente mediante citometría de flujo; directrices aprobadas—Segunda edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2007. Documento CLSI H42-A2.
 33. Giorgi JV. Mediciones del subgrupo de linfocitos: importancia en la medicina clínica. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL., editores Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:236- 246.
 34. Jackson AL, Warner NL. Preparación, tinción y análisis por citometría de flujo de leucocitos periféricos en la sangre.. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL., editores Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:226- 235.
 35. Lista de verificación del citómetro de flujo. http://www.cap.org/apps/docs/laboratory_accreditation/laboratory_accreditation_checklist_order_form_.pdf
 36. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influencia del origen racial en la distribución de las poblaciones de células T y de los linfocitos con Leu-11 positivo en donantes de sangre sanos. Inmunología diagnóstica. 1985;03:33-37.

37. Definición, establecimiento y verificación de los intervalos de referencia en el laboratorio clínico: Pauta aprobada —Tercera edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2010. Documento CLSI EP28 - A3c.S
38. Procedimiento de medición y estimación de sesgo con muestras de pacientes; Pautas aprobadas—Tercera edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2013. Documento CLSI EP09-A3.
39. Evaluación de la precisión de los procedimientos de medición cuantitativa— Tercera edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2014. Documento CLSI EP05-A3.



Karina Valeria Traverso
Co Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Hoja Adicional de Firmas
Informe gráfico

Número:

Referencia: Rótulos e Ifus IVD EX-2021-64230010- -APN-DGA#ANMAT

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 155 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2022.05.24 12:20:10 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.05.24 12:20:12 -03:00