República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Disposición

Número: DI-2022-5017-APN-ANMAT#MS

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Martes 14 de Junio de 2022

Referencia: EX-2020-53104945-APN-DGA#ANMAT

VISTO el Nº EX-2020-53104945-APN-DGA#ANMAT del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma BECKMAN COULTER ARGENTINA S.A solicita autorización para la venta de los Productos médicos para diagnóstico *in vitro* denominados: **DuraClone B27; DuraClone Tri T-Stat CD3, CD4, CD8.**

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley Nº 16.463, Resolución Ministerial Nº 145/98 y Disposición ANMAT Nº 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 del producto médico para diagnóstico *in vitro* objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Decreto Nº 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE

MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

D I S P O N E:

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* denominados: **1) DuraClone B27; 2) DuraClone Tri T-Stat CD3, CD4, CD8** de acuerdo con lo solicitado por la firma BECKMAN COULTER ARGENTINA S.A., 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-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT.

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda "Autorizado por la ANMAT PM 1109-396", con exclusión de toda otra leyenda no autorizada y/o contemplada en la normativa vigente.

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

ARTÍCULO 5º.- Regístrese. Inscríbase 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 4°. 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) DuraClone B27; 2) DuraClone Tri T-Stat CD3, CD4, CD8.

INDICACIÓN DE USO: 1) El reactivo consta de un colorante con inmunofluorescencia de dos colores adecuado para la detección de la expresión del antígeno HLA-B27 en muestras de sangre completa mediante el uso de un lisante y protocolo de no lavado en un citómetro de flujo. Este reactivo **no** se ha diseñado para utilizarlo con el fin de determinar el grupo de tejido de HLA-B27; 2) El reactivo consta de un colorante con inmunofluorescencia de tres colores para la identificación y la enumeración de linfocitos T colaboradores/inductores (CD4+), linfocitos T citotoxicos/supresores (CD8+) y linfocitos T totales (CD3+) combinado con un número preciso de esferas de recuento fluorescente para la determinación de recuentos absolutos de células T CD3+, CD4+ y CD8+. Este reactivo está concebido para análisis basados en citometría de flujo en muestras humanas de sangre completa.

FORMA DE PRESENTACIÓN: 1) Envases por 50 determinaciones conteniendo: 50 tubos con reactivo DuraClone B27 secos de un solo uso y 1 vial x 25 mL de DuraLyse; 2) Envases por 50 determinaciones conteniendo: 50 tubos con reactivo DuraClone TriT Stat CD3, CD4, CD8 listos para usar y 1 vial x 25 mL de DuraLyse.

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 1) y 2) 12 (DOCE) meses desde la fecha de elaboración, conservado entre 20 y 30°C.

FABRICANTE NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL: Beckman Coulter India Pvt. Ltd. 50 B, II Phase (Near TVS Cross) Peenya Industrial Area, Peenya, Bengalore, 560058 (INDIA) para Immunotech S.A.S., A Beckman Coulter Company, 130 Avenue de Lattre de Tassigny-BP177-13276 Marseille Cedex 9 (FRANCIA).

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

Nº EX-2020-53104945-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by GARAY Valeria Teresa
Date: 2022.06.14 16:37:14 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Valeria Teresa Garay
Subadministradora Nacional
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

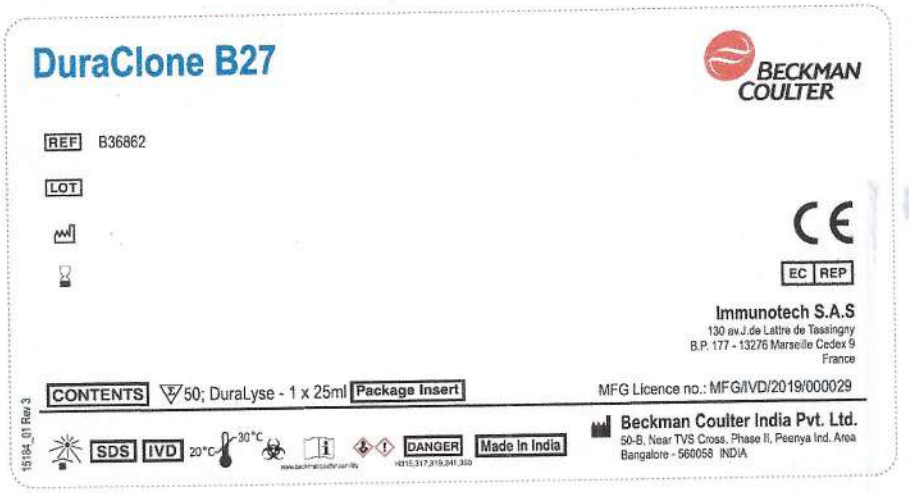
Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2022.06.14 16:37:16 -03:00

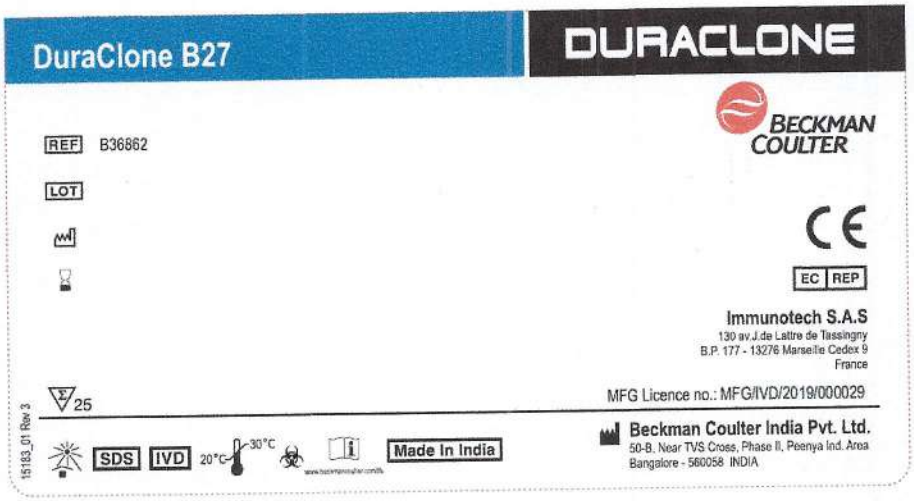
PROYECTOS DE RÓTULO EXTERNO

Nota: por art. 1° de la **Disposición n° 4043/2005**ANMAT, se acepta el uso de los 24 símbolos descritos y definidos en el Anexo I de la citada norma en reemplazo del texto de la información requerida en la presente Disposición en los rótulos de los productos para diagnóstico de uso in vitro.

RÓTULO ORIGINAL DEL PRODUCTO

1) DuraClone B27 (B36862)





. Nombre del Producto	DuraClone B27
2. a) Nombre y dirección del Importador	Rótulo Local
b) Nombre del Director Técnico	Rótulo Local
c) Nombre y dirección del Elaborador	Rótulo Local
d) Nombre y dirección del Fabricante Legal	**Immunotech S.A.S** 130 av.J.de Lattre de Tassigny B.P. 177 - 13276 Marseille Cedex 9 France

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

Gabriela A. Clividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

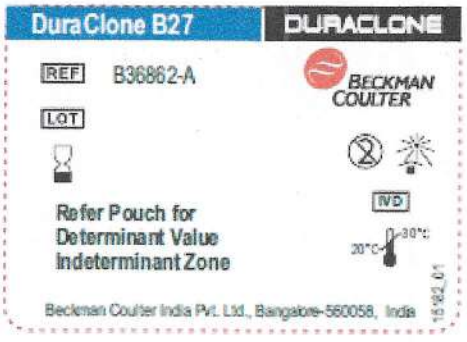
3. Leyenda "Autorizado por la ANMAT"	Rótulo Local
4. Número de lote o partida	
5. Fecha de Vencimiento	
6. Constitución del equipo (relación de los componentes)	50; DuraLyse - 1 x 25ml
7. Leyenda "Uso In Vitro"	
8. Descripción de la finalidad de uso del producto	
9. Descripción de las precauciones	
10. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	

RÓTULO LOCAL (PUESTO POR EL IMPORTADOR/DISTRIBUIDOR EN ARGENTINA)

Beckman Coulter Argentina, Gral. Martin M. Güemes. 4168 B1603EN Villa Martelli, Bs. As
Directora Técnica: Farmacéutica Gabriela A. Cividino
Fabricante Legal: Immunotech S.A.S. A Beckman Coulter Company 130 Avenue de Lattre de Tassigny-BP177-13276 Marseille Cedex 9-France
Fabricante Real: Beckman Coulter India Pvt. Ltd. 50 B, II Phase (Near TVS Cross) Peenya Industrial Area, Peenya, Bengalore-560058, India
Autorizado por ANMAT- PM 1109-396

PROYECTOS DE RÓTULO INTERNO

Nota: por art. 1° de la **Disposición n° 4043/2005**ANMAT, se acepta el uso de los 24 símbolos descritos y definidos en el Anexo I de la citada norma en reemplazo del texto de la información requerida en la presente Disposición en los rótulos de los productos para diagnóstico de uso in vitro.



Dr. EDGARDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACEUTICA
M.N. 15202 M.P. 16093

1. Nombre del Producto	DuraClone B27
2. Número de lote o partida	
3. Fecha de Vencimiento	
4. Indicación de las unidades métricas, tales como volumen, peso, actividad u otra unidad característica de cada componente del producto	1 unidad
5. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACEUTICA
M.N. 18021 M.P. 18093

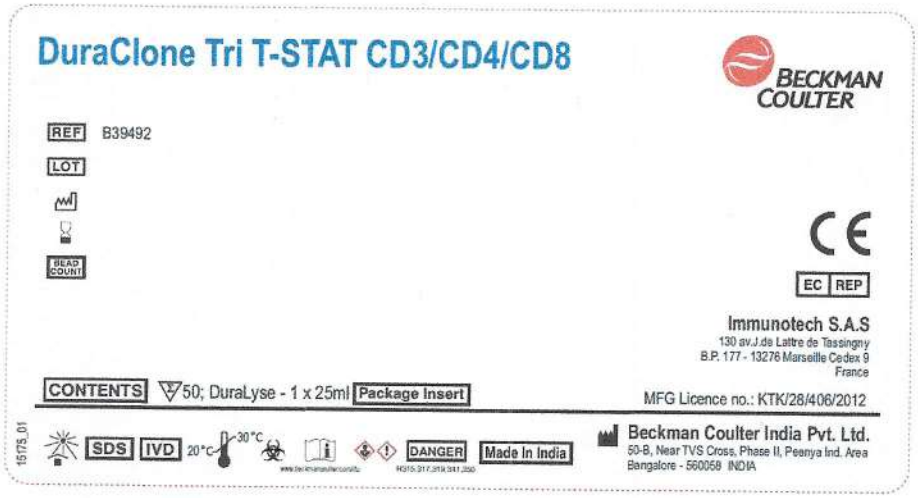
IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

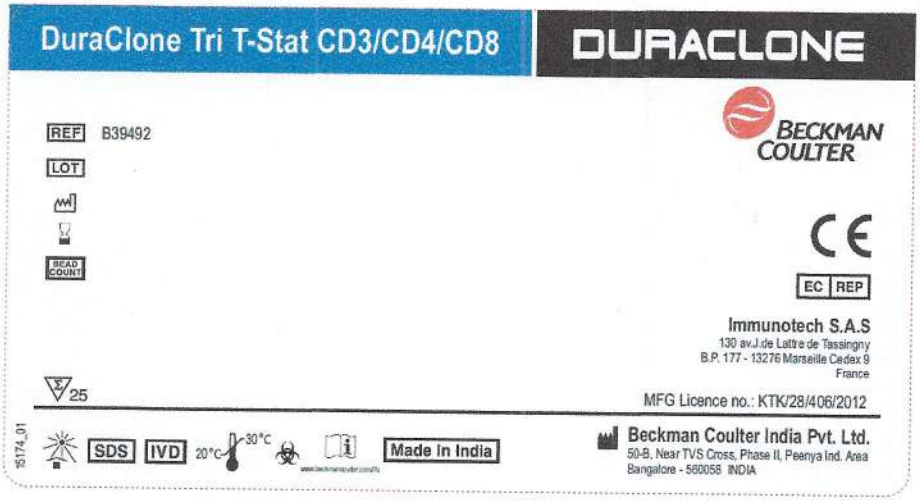
PROYECTOS DE RÓTULO EXTERNO

Nota: por art. 1° de la **Disposición n° 4043/2005**ANMAT, se acepta el uso de los 24 símbolos descritos y definidos en el Anexo I de la citada norma en reemplazo del texto de la información requerida en la presente Disposición en los rótulos de los productos para diagnóstico de uso in vitro.

RÓTULO ORIGINAL DEL PRODUCTO

2) DuraClone Tri T Stat CD3/CD4/CD8 (B39492)

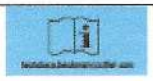




1. Nombre del Producto	DuraClone Tri T Stat CD3CD4CD8
2. a) Nombre y dirección del Importador	Rótulo Local
b) Nombre del Director Técnico	Rótulo Local
c) Nombre y dirección del Elaborador	Rótulo Local
d) Nombre y dirección del Fabricante Legal	**Immunotech S.A.S** 130 av.J.de Lattre de Tassigny B.P. 177 - 13276 Marseille Cedex 9 France

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

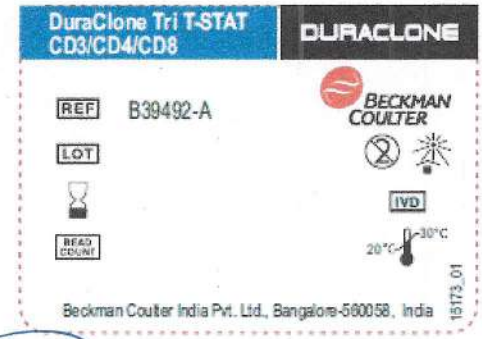
3. Leyenda "Autorizado por la ANMAT"	Rótulo Local
4. Número de lote o partida	
5. Fecha de Vencimiento	
6. Constitución del equipo (relación de los componentes)	50; DuraLyse - 1 x 25ml
7. Leyenda "Uso In Vitro"	
8. Descripción de la finalidad de uso del producto	
9. Descripción de las precauciones	
10. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	

RÓTULO LOCAL (PUESTO POR EL IMPORTADOR/DISTRIBUIDOR EN ARGENTINA)

Beckman Coulter Argentina, Gral. Martin M. Güemes. 4168 B1603EN Villa Martelli, Bs. As
Directora Técnica: Farmacéutica Gabriela A. Cividino
Fabricante Legal: Immunotech S.A.S. A Beckman Coulter Company 130 Avenue de Lattre de Tassigny-BP177-13276 Marseille Cedex 9-France
Fabricante Real: Beckman Coulter India Pvt. Ltd. 50 B, II Phase (Near TVS Cross) Peenya Industrial Area, Peenya, Bengalore-560058, India
Autorizado por ANMAT- PM 1109-396

PROYECTOS DE RÓTULO INTERNO

Nota: por art. 1° de la **Disposición n° 4043/2005**ANMAT, se acepta el uso de los 24 símbolos descritos y definidos en el Anexo I de la citada norma en reemplazo del texto de la información requerida en la presente Disposición en los rótulos de los productos para diagnóstico de uso in vitro.



Dr. EDGARDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

1. Nombre del Producto	DuraClone Tri T Stat CD3CD4CD8
2. Número de lote o partida	
3. Fecha de Vencimiento	
4. Indicación de las unidades métricas, tales como volumen, peso, actividad u otra unidad característica de cada componente del producto	1 unidad
5. Indicación de las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte del producto	

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A.
M.N. 15202/ M.P. 18093

IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

PROYECTO DE MANUAL DE INSTRUCCIONES

Ver adjunto Instrucciones de Uso del Producto.

Dr. EDGARDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 18.124 - M.P. 1-23-4

IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

DuraClone B27
Equipo de reactivos

REF **B36862: 50 pruebas**

IFU- B36862-11.0

CE BECKMAN COULTER

	Especificación del constituyente 1	Especificación de constituyente 2	Especificación del constituyente 3	Especificación del constituyente 4
Especificidad	CD3	HLA-B27	HLA-B27	HLA-B7
Clon	UCHT1	ABCm3	FD705	BB7.1
Inmunógeno	Timocitos humanos y linfocitos de sangre periférica de un paciente con leucemia de células de Sezary	Complejo inmunológico precipitado de la estirpe celular positiva HLA-B27 (Bordin) mediante el anticuerpo anti HLA y la proteína A de estafilococo	Estirpe celular humana positiva HLA-B27.	Antígeno HLA-B7 solubilizado de papaína.
Isotipo	IgG1 κ	IgG2a	IgG2b	IgG1
Reactividad	Humanos/chimpancés	Humanos	Humanos	Humanos
Host	Ratón	Ratón	Ratón	Ratón
Fluorocromo	PE-Dyomics649	R-ficoeritrina (PE)	R-ficoeritrina (PE)	NA
Excitación λ	488 nm	488 nm	488 nm	NA
Pico de emisión	676 nm	575 nm	575 nm	NA

IVD

USO PREVISTO

El reactivo DuraClone B27 consta de un colorante con inmunofluorescencia de dos colores adecuado para la detección de la expresión del antígeno HLA-B27 en muestras humanas de sangre completa mediante el uso de un lisante y protocolo de no lavado en un citómetro de flujo. Este reactivo no se ha diseñado para utilizarlo con el fin de determinar el grupo de tejido de HLA-B27.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El antígeno leucocitario humano (HLA) B27 es un antígeno superficial de Clase I codificado por el locus B en el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) que presenta antígenos microbianos a linfocitos T.[10,11] La aparición de espondiloartropatía seronegativa[9] que incluye espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, artritis psoriásica y enfermedad inflamatoria intestinal[1-4] está asociada con el genotipo HLA-B27. Por lo tanto, la detección de HLA-B27 tiene importancia clínica junto con la presentación sintomática del trastorno. Las pruebas de microlinfocitotoxicidad o las pruebas moleculares se suelen utilizar en la tipificación de HLA, pero son lentas y caras. La citometría de flujo ha evolucionado gradualmente hacia un método más rápido y fiable para el análisis de muestras en busca del antígeno HLA-B27.[5,6]

FUNDAMENTOS DE LA DETERMINACIÓN

Esta prueba se basa en la capacidad de los anticuerpos monoclonales específicos de ligarse a determinantes antigénicos expresados por linfocitos T en la superficie. La coloración específica de los linfocitos T se realiza incubando la muestra de sangre completa humana con el reactivo DuraClone B27 que contiene el anticuerpo anti-CD3. Las muestras teñidas se tratan con DuraLyse para lisar los eritrocitos y fijarlos antes del análisis en el citómetro de flujo.

Se ha demostrado que la preselección de linfocitos T aumenta la especificidad de la prueba mediante la discriminación negativa de las demás poblaciones de leucocitos y residuos. Para minimizar el riesgo de reacciones cruzadas de alelos, se añade un anticuerpo anti-B7 a la mezcla de reactivos. El anticuerpo anti-B7 compite con el anticuerpo anti-B27 por el antígeno B7 y, de ese modo, reduce la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-B27 en relación con los antígenos B7.[1] El reactivo DuraClone B27 contiene dos clones del anticuerpo anti-HLA-B27 y un anticuerpo anti-B7. La presencia de dos clones del anticuerpo anti-HLA-B27 mejora la sensibilidad del ensayo[1,7].

El reactivo DuraClone B27 también contiene esferas fluorescentes de referencia, que se utilizan para realizar una calibración inicial del ensayo ajustando su mediana de intensidades de fluorescencia (MdFI) en regiones objetivo definidas. A partir de esta configuración, los linfocitos T elegidos mediante la selección de la población específica de $CD3^+$ se analizan mediante tinción con conjugados de HLA-B27.

El resultado de la prueba es una comparación directa de la MdFI de HLA-B27 de la población de linfocitos T con el valor **"Determinant"** ("determinante"). El valor determinante es el valor de corte para tipificar la muestra como HLA-B27 positiva o negativa. Se define una **Zona indeterminada** alrededor del Determinante para justificar la variabilidad asociada al proceso y se calcula como variación de operarios, lotes e instrumentos. Se debe confirmar la tipificación de muestras que se encuentren en esta zona utilizando métodos alternativos, como PCR.

REACTIVOS

El kit de reactivos DuraClone B27 contiene lo siguiente:

- 50 tubos DuraClone B27 secos de un solo uso
- 1 x 25 ml de DuraLyse

COMPOSICIÓN DEL REACTIVO

El reactivo DuraClone B27 es un reactivo seco formulado en solución salina tamponada con estabilizadores. Contiene R-ficoeritrina (PE): anticuerpos monoclonales HLA-B27 antihumanos marcados (clones FD705 y ABCm3), PE-Dyomics649: anticuerpo monoclonal CD3 antihumano marcado (clon UCHT1) y anticuerpo B7 antihumano no marcado (clon BB7.1).[1,7,12,13,14] El reactivo también contiene esferas fluorescentes de referencia para facilitar la calibración interna del ensayo para la tipificación del antígeno HLA-B27.

PRECAUCIONES

PELIGRO
Formaldehído < 3 %
Provoca irritación cutánea.
Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
Provoca irritación ocular grave.
Se sospecha que provoca defectos genéticos.
Puede causar cáncer.
Pedir instrucciones especiales antes del uso.
Llevar guantes, prendas y gafas o máscara de protección.
En caso de exposición manifiesta o presunta: solicite atención/asistencia médica.
Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de utilizarlas.
SDS La hoja de datos de seguridad se encuentra disponible en ***beckman.com/techdocs.***

1. Todas las muestras de sangre se consideran un posible riesgo biológico. Manipúlelas como si pudieran transmitir infecciones y deséchelas con la debida precaución de conformidad con la normativa gubernamental y regional aplicable.
2. La adición del volumen preciso de sangre es fundamental para la obtención de resultados precisos. Utilice una pipeta calibrada y utilícela de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
3. El reactivo DuraClone B27 se suministra en forma seca. Después de la adición de la muestra de sangre, es necesario agitarla en el vórtex durante 6-8 segundos para asegurar la solubilización del reactivo.
4. DuraLyse contiene dietilenglicol y formaldehído. El formaldehído es un carcinógeno potencial que irrita los ojos y la piel. La ingestión de dietilenglicol puede provocar la muerte.
5. Para obtener resultados coherentes, Beckman Coulter recomienda encarecidamente cumplir el protocolo de ensayo, adquisición y análisis de DuraClone B27 de manera estricta, tal como se describe en las instrucciones de uso.
6. Los tubos de reactivo deben eliminarse según la normativa gubernamental y regional pertinente.
7. Los materiales del envase deben eliminarse según la normativa regional pertinente.
8. Los valores del determinante y la zona indeterminada pueden variar de un lote a otro.
9. No utilice reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.
10. El uso de reactivo más de 45 días después de haberlo abierto o un nuevo sellado insuficiente de la bolsa una vez abierta puede causar merma del rendimiento

ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Este reactivo permanece estable durante 12 meses desde la fecha de fabricación. Consulte la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta del envase. Almacene el reactivo entre 20 y 30 °C en un lugar seco protegido de la exposición directa a la luz. Una vez se hayan extraido los tubos necesarios, vuelva a sellar la bolsa que contiene en el interior los tubos restantes y la bolsita desecante. Una vez que se haya abierto la bolsa, utilice los reactivos en un periodo de 45 días.

SIGNOS DE DETERIORO

Si el envase está deteriorado, los datos obtenidos muestran una alteración del rendimiento, o se recibe un producto dañado, póngase en contacto con Beckman Coulter.

REQUISITOS DE LOS INSTRUMENTOS

El reactivo DuraClone B27 está diseñado para su uso en citómetros de flujo equipados con un láser de 488 nm que puede detectar dispersión frontal y dispersión lateral, y que es compatible con los espectros de emisión de los fluorocromos utilizados en el reactivo. Beckman Coulter

Dr. EDGARDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

recomienda utilizar los citómetros de flujo Navios, Cytomics FC 500, BD FACSCalibur™, BD FACSCanto™ II o DxFLEX para este reactivo.

Para el reactivo puede utilizarse cualquiera de los siguientes instrumentos recomendados:

1. Citómetro de flujo Navios (B47903, B47904 o B47905) utilizando esferas de calibración de instrumentos con ref. A63493
2. Cytomics FC 500 (626553 o equivalente) utilizando esferas de calibración de instrumentos con ref. 6605359
3. Sistema BD FACSCanto™ II (338962 o equivalente) utilizando esferas de calibración de instrumentos BD con ref. 340486
4. Citómetro de flujo BD FACSCalibur™ (342973 o equivalente) utilizando esferas de calibración de instrumentos BD con ref. 340486
5. Citómetro de flujo DxFLEX con software CytExpert para DxFLEX (versión 2 o superior), Cargador automático (opcional) y fluorosferas de control de calidad diario

Los instrumentos deben calibrarse para la configuración de voltajes de tubo fotomultiplicador y se debe comprobar la sensibilidad de los instrumentos según las directrices del fabricante.
Este reactivo se ha verificado y validado en las siguientes versiones del software BD:

- BD FACSCanto™ II con el software BD FACSDiva™ 7 y BD FACSDiva™ 8.0.1.
- BD FACSCalibur™ con la versión 5.2.1. del software CellQuest™ Pro.

EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

Siga las directrices del fabricante de la probeta de extracción para conocer el volumen de sangre que se debe recoger.

La sangre anticoagulada (recogida en K2 o K3 EDTA) se debe almacenar a una temperatura comprendida entre 18 y 25 °C, y se debe procesar antes de que transcurran 48 horas tras la punción venosa. Las muestras procesadas se deben almacenar a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C, y se deben proteger de la luz del sol y adquirir antes de que transcurran 24 horas tras el procesamiento. Las muestras procesadas deben adquirirse en un plazo de 2 horas cuando se almacenan a 18-25 °C.

PROCEDIMIENTO

MATERIALES SUMINISTRADOS

Kit de reactivos DuraClone B27
REF B36862

- Tubos de reactivos DuraClone B27
- DuraLyse

MATERIALES NECESARIOS, PERO NO SUMINISTRADOS

Tubo de extracción de sangre que contiene K_2EDTA o K_3EDTA

Pipetas calibradas

Mezclador de vórtex

Fluido envolvente

Consulte la sección Instrumentos para determinar el citómetro de flujo, el software y las fluorosferas de control de calidad o las esferas de calibración disponibles en su región geográfica, o póngase en contacto con su representante local de Beckman Coulter.

Protocolo de ensayo

1. Asegúrese de que la muestra de sangre esté adecuadamente mezclada y homogeneizada. Pipetee hacia atrás 25 µl de muestra de sangre en la parte inferior de un tubo de reactivo DuraClone B27 de un solo uso.
2. Agite el tubo en el vórtex durante 6-8 segundos e incúbelo durante 25-30 minutos a una temperatura entre 18 y 25 °C alejado de la exposición directa a la luz.
3. Añada 500 µl de la solución DuraLyse lista para usar al tubo y agítelo bien en el vórtex durante 6-8 segundos.
4. Incube el tubo en un lugar oscuro durante al menos 15 minutos a una temperatura entre 18 y 25 °C.
5. Antes de adquirirlas en el citómetro de flujo, agite cada muestra en el vórtex.

ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS para los citómetros de flujo Navios, Cytomics FC 500, BD FACSCalibur™, BD FACSCanto™ II y DxFLEX

NOTA: Este protocolo es específico para los citómetros de flujo Navios, Cytomics FC 500, BD FACSCalibur™, BD FACSCanto™ II y DxFLEX y presupone que el citómetro de flujo se ha configurado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, en el caso del citómetro de flujo Navios, el instrumento debe haber aprobado la verificación diaria de la alineación y del sistema fluídico con las fluoroesferas Flow-Check Pro y el software de Navios. Del mismo modo, en el caso del citómetro de flujo BD FACSCalibur™, el instrumento se debe configurar y calibrar con las esferas BD CaliBRITE™, según recomienda el fabricante.

Citómetros de flujo Navios y Cytomics FC 500

1. Abra el software de Navios o Cytomics FC 500 CXP para establecer la conexión con el citómetro de flujo. A continuación se indican los filtros fluorescentes mencionados en las secciones posteriores:

   Citómetros de flujo Navios:
   - FL1: 525 ± 30 nm
   - FL2: 575 ± 25 nm
   - FL4: 695 ± 30 nm

   Citómetros de flujo Cytomics FC 500:
   - FL1: 525 ± 10 nm
   - FL2: 575 ± 10 nm
   - FL4: 675 ± 10 nm

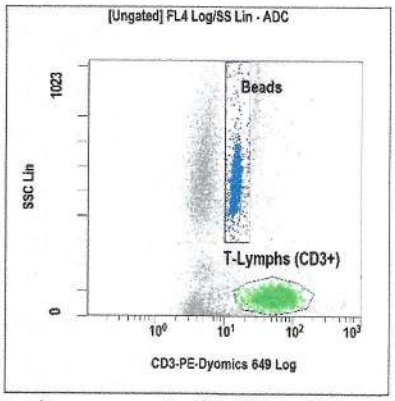
2. Establezca en cero la compensación en todos los canales.
3. Trace dos gráficos de dispersión como en la Figura 1 y la Figura 2, y cuatro histogramas como en la Figura 3, la Figura 4, la Figura 5 y la Figura 6 (6a/6b/6c):
4. Compruebe la opción Set up mode (Modo de configuración) de la ventana Cytometer Control (Control del citómetro) e inicie la adquisición.
   a. Figura 1 (trazado de puntos): gráfico FL4 log frente a dispersión lateral (SSC-lineal).
      1) Ajuste la SSC y el voltaje de FL4 para adquirir linfocitos T y esferas.
      2) Asigne a las regiones los nombres "T-Lymphs (CD3+)" (linfocitos T [CD3+]) y "Beads" (esferas), respectivamente.
      3) Asegúrese de que se adquieran las poblaciones de esferas y linfocitos, y que se puedan visualizar de manera separada del fondo.
   b. Figura 2 (trazado de puntos): gráfico FL1 log frente a FL2 log.
      1) Aplique la ventana de selección "Beads" (Esferas) de la Figura 1 para obtener las esferas fluorescentes de referencia. Estas esferas tienen una intensidad de fluorescencia alta en FL1 y FL2.
      2) Asigne a la región el nombre "Ref. Beads" (Esferas de referencia).
   c. Figura 3 (histograma): gráfico FL1 log frente a recuentos.
      1) Aplique la ventana de selección "Ref. Beads" (Esferas de referencia) de la Figura 2.
      2) Trace un marcador de región con el límite inferior 14 y el límite superior 26.
      3) Ajuste el voltaje de FL1 para colocar las esferas dentro de esta región y así conseguir una MdFI final de Ref. Beads (Esferas de referencia) de **19 ±0,5.**
   d. Figura 4 (histograma): gráfico FL2 log frente a recuentos.
      1) Aplique la ventana de selección "Ref. Beads" (Esferas de referencia) de la Figura 2.
      2) Trace un marcador de región con el límite inferior 14 y el límite superior 26.
      3) Ajuste el voltaje de FL2 para colocar las esferas dentro de esta región y así conseguir una MdFI final de Ref. Beads (Esferas de referencia) de **19 ±0,5.**
   e. Figura 5 (histograma): gráfico FL4 log frente a recuentos.
      1) Aplique la ventana de selección "Ref. Beads" (Esferas de referencia) de la Figura 2.
      2) Trace un marcador de región con el límite inferior 11 y el límite superior 22.
      3) Ajuste el voltaje de FL4 para colocar las esferas dentro de esta región y así conseguir una MdFI final de Ref. Beads (Esferas de referencia) de **15 ±0,5.**
   f. Figura 6 (histograma): gráfico FL2 log frente a recuentos. Aplique la ventana de selección "T-Lymphs (CD3+)" (linfocitos T [CD3+]) de la Figura 1.
5. Establezca la condición Detener y guardar en 3000 Ref. Beads (Esferas de referencia) para el histograma de la Figura 4.
6. Configure la opción Discriminator (Discriminador) en FL4 Log. Ajuste el límite superior del discriminador de manera que se minimicen los residuos.
7. Desactive la opción "Set up mode" (Modo de configuración) de la ventana Cytometer Control (Control del citómetro) y adquiera 3000 eventos de Ref. Beads (Esferas de referencia).

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

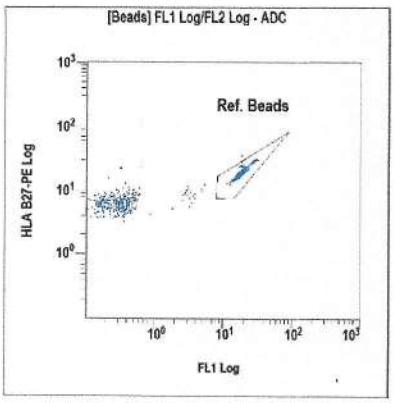
Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

Figura 1



Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa

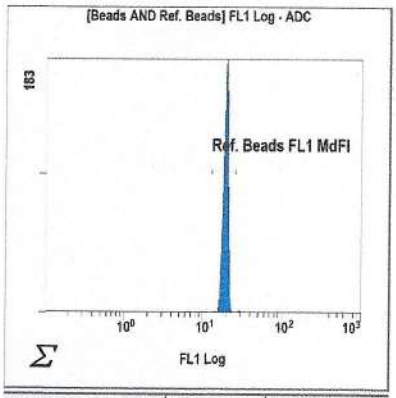
Figura 2



Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa

- **Figura 1**: Fluorescencia CD3-PE-Dy649 (FL4: escala logarítmica) frente a dispersión lateral (SSC: escala lineal) para obtener linfocitos T CD3+ y esferas.
- **Figura 2**: FL1 frente a FL2 (ambos en escala logarítmica) con la ventana de selección "Beads" (Esferas) de la Figura 1 aplicada para obtener diferentes esferas fluorescentes de referencia.

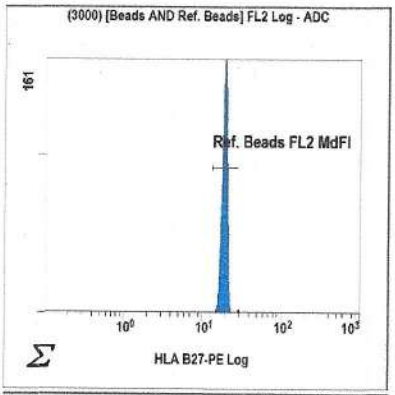
Figura 3



Region	Number	X-Median 50.0
ALL	3002	19
Ref. Beads FL1 MdFI	2947	19

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa

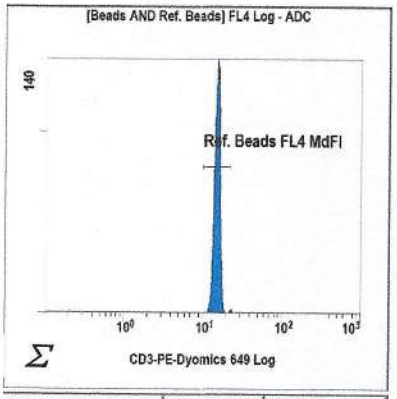
Figura 4



Region	Number	X-Median 50.0
ALL	3002	19
Ref. Beads FL2 MdFI	2952	19

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa

Figura 5

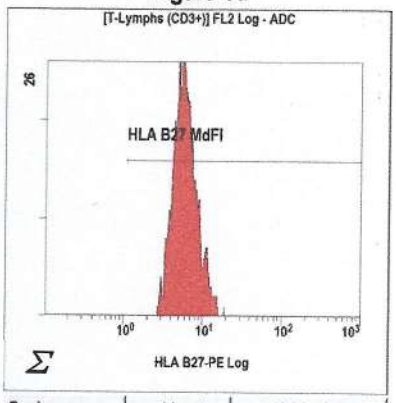


Region	Number	X-Median 50.0
ALL	3002	14.9
Ref. Beads FL4 MdFI	2962	14.9

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa

- **Figura 3, 4 y 5**: histograma que representa "Ref. beads" (Esferas de referencia) en los canales FL1, FL2 y FL4, respectivamente.

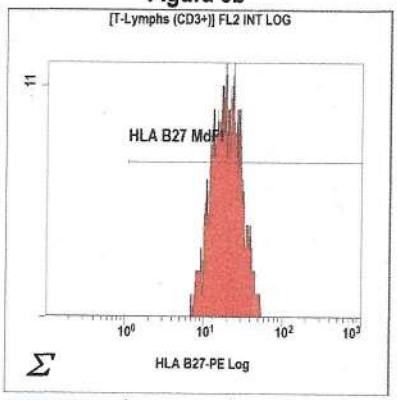
Figura 6a



Region	Number	X-Median 50.0
ALL	2764	5.86
HLA B27 MdFI	2761	5.86

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa

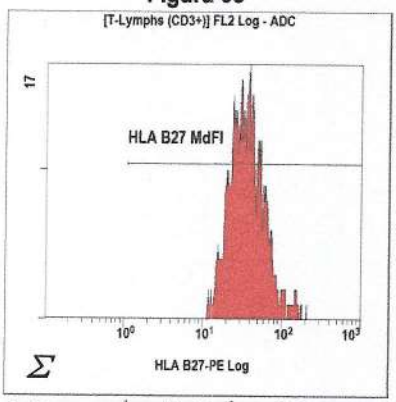
Figura 6b



Region	Number	X-Median 50.0
ALL	1722	19.7
HLA B27 MdFI	1711	19.7

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 positiva que está dentro de la zona indeterminada

Figura 6c



Region	Number	X-Median 50.0
ALL	2568	35.4
HLA B27 MdFI	2564	35.4

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 positiva

- **Figura 6a**: histograma de una muestra negativa HLA-B27
- **Figura 6b**: histograma de una muestra positiva HLA-B27 que está dentro de la zona indeterminada
- **Figura 6c**: histograma de una muestra positiva HLA-B27

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

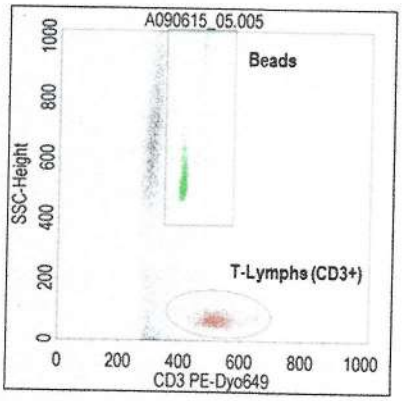
Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

Estos gráficos representativos se han obtenido mediante un lote de reactivo con un determinante de 19 y una zona indeterminada de 15 a 23.
Nota: El determinante y la zona indeterminada son específicos de un lote concreto de reactivo DuraClone B27 y pueden presentar modificaciones en diferentes lotes del reactivo.

Citómetros de flujo BD (BD FACSCanto™ II y BD FACSCalibur™)

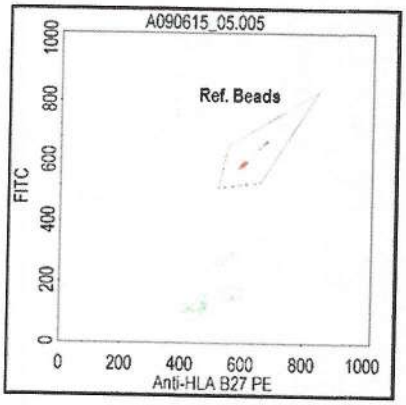
1. Abra el software BD FACSDiva™ (para BD FACSCanto™ II) o CellQuest™ Pro (para BD FACSCalibur™) y conéctelo al citómetro.
2. A continuación se indican los filtros fluorescentes mencionados en las secciones posteriores:
   - FL1: 530 ± 30 nm
   - FL2: 585 ± 42 nm
   - FL3: 670 o 650 nm LP
3. Abra un documento nuevo (File [Archivo] > New document [Nuevo documento]) y seleccione la opción para ver la configuración del instrumento para el citómetro de flujo BD FACSCalibur™.
4. Cree un nuevo experimento y póngale un nombre a la muestra. Añada el número necesario de tubos al nombre de la muestra creado para el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II.
5. Establezca en cero la compensación en todos los canales.
6. Asegúrese de que las estadísticas de ambos instrumentos se muestran en **Channel Values (0-1023)** (Valores del canal [0-1023]) Las instrucciones para configurar el intervalo de visualización en los valores del canal se proporcionan en el manual de instrucciones del software correspondiente (CellQuest™ Pro y BD FACSDiva™).
7. Trace dos gráficos de dispersión como en la Figura 7 y la Figura 8, y cuatro histogramas como en la Figura 9, la Figura 10, la Figura 11 y la Figura 12 (12a/12b/12c).
8. Compruebe la opción "Setup" (Configuración) desde la barra de herramientas Acquisition Control (Control de adquisición) e inicie la adquisición:
   a. Figura 7 (trazado de puntos): gráfico FL3 (CD3 PE-Dy649) frente a SSC-lineal.
      1) Ajuste la dispersión lateral y el voltaje de FL3 para adquirir linfocitos T y esferas.
      2) Asigne a las regiones los nombres "T-Lymphs (CD3+)" (Linfocitos T [CD3+]) y "Beads" (Esferas), respectivamente.
      3) Asegúrese de que se adquieran las poblaciones de esferas y linfocitos y que se puedan visualizar de manera separada del fondo.
   b. Figura 8 (trazado de puntos): gráfico FL1 log frente a FL2 log.
      1) Aplique la ventana de selección "Beads" (Esferas) de la Figura 7 para obtener las esferas fluorescentes de referencia. Estas esferas tienen una intensidad de fluorescencia alta en FL1 y FL2.
      2) Asigne a la región el nombre "Ref. Beads" (Esferas de referencia).
   c. Figura 9 (histograma): gráfico FL1 log frente a recuentos.
      1) Aplique la ventana de selección "Ref. Beads" (Esferas de referencia) de la Figura 8.
      2) Trace un marcador de región alrededor de la escala de canal 600.
      3) Ajuste el voltaje de FL1 para colocar las esferas dentro de esta región y así conseguir una MdFI final de Ref. Beads (Esferas de referencia) de **600 ±10**.
   d. Figura 10 (histograma): gráfico FL2 log frente a recuentos.
      1) Aplique la ventana de selección "Ref. Beads" (Esferas de referencia) de la Figura 8.
      2) Trace un marcador de región alrededor de la escala de canal 600.
      3) Ajuste el voltaje de FL2 para colocar las esferas dentro de esta región y así conseguir una MdFI final de Ref. Beads (Esferas de referencia) de **600 ± 10**.
   e. Figura 11 (histograma): gráfico FL3 log frente a recuentos.
      1) Aplique la ventana de selección "Ref. Beads" (Esferas de referencia) de la Figura 8.
      2) Trace un marcador de región alrededor de la escala de canal 400. Ajuste el voltaje de FL3 para colocar las esferas dentro de esta región y así conseguir una MdFI final de Ref. Beads (Esferas de referencia) de **400 ±10.**
   f. Figura 12 (histograma): gráfico FL2 log frente a recuentos. Aplique la ventana de selección "T-Lymphs (CD3+)" (Linfocitos T [CD3+]) de la Figura 7.
9. Configure los criterios de adquisición de 3000 eventos de "Ref. Beads" (Esferas de referencia).
10. Establezca el umbral en FL3. Ajuste el límite superior del umbral de manera que se minimicen los residuos.
11. Desactive la opción "Setup" (Configuración) desde la barra de herramientas Acquisition Control (Control de adquisición) y adquiera 3000 eventos de Ref. Beads (Esferas de referencia).
    1) Seleccione la opción de estadísticas de histograma para la Figura 9, la Figura 10, la Figura 11 y la Figura 12.

Figura 7



Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa

Figura 8



Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa

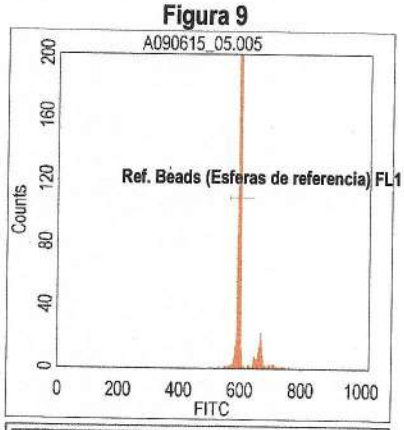
- **Figura 7 (trazado de puntos):** fluorescencia CD3 PE-Dy649 (FL3) frente a dispersión lateral (SSC: escala lineal) para capturar linfocitos T CD3+ y esferas.
- **Figura 8 (trazado de puntos)**: FL1 frente a FL2 con la ventana de selección Beads (Esferas) de la Figura 7 aplicada para obtener diferentes esferas fluorescentes de referencia.

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

Gabriela A. Olivarino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

Figura 9

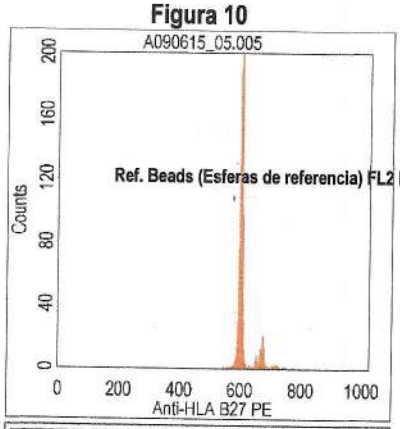


Histogram Statistics
File: A090615_05.005
Log Data Units: Channel Values
Acquisition Date: 10-Jun-15
Gate: Ref Beads
X Parameter: FITC (Log)

Marker	Median
All	595.00
Ref. Beads FL1 MdFI 600	594.00

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa

Figura 10

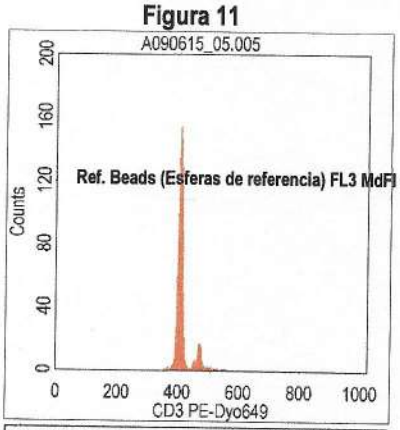


Histogram Statistics
File: A090615_05.005
Log Data Units: Channel Values
Acquisition Date: 10-Jun-15
Gate: Ref Beads
X Parameter: Anti-HLA B27 PE (Log)

Marker	Median
All	601.00
Ref. Beads FL2 MdFI 600	600.00

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa

Figura 11



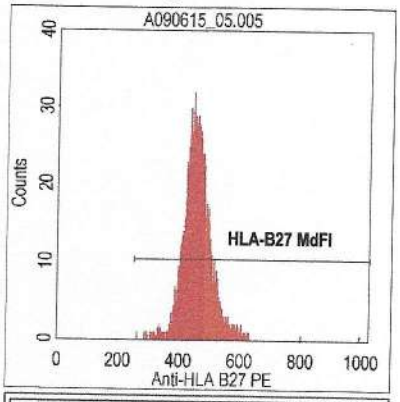
Histogram Statistics
File: A090615_05.005
Log Data Units: Channel Values
Acquisition Date: 10-Jun-15
Gate: Ref Beads
X Parameter: CD3 PE-Dyo649 (Log)

Marker	Median
All	407.00
Ref. Beads FL3 MdFI 400	406.00

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa

- **Figura 9, 10 y 11**: histograma que representa "Ref. beads" (Esferas de referencia) en los canales FL1, FL2 y FL3, respectivamente.

Figura 12a

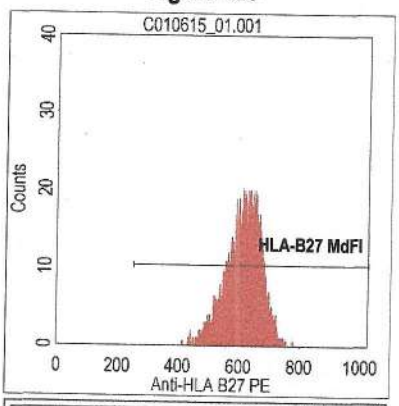


Histogram Statistics
File: A090615_05.005
Log Data Units: Channel Values
Acquisition Date: 10-Jun-15
Gate: T-Lymphs
X Parameter: Anti-HLA B27 PE (Log)

Marker	Median
All	455.00
Sample MdFI	455.00

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa

Figura 12b

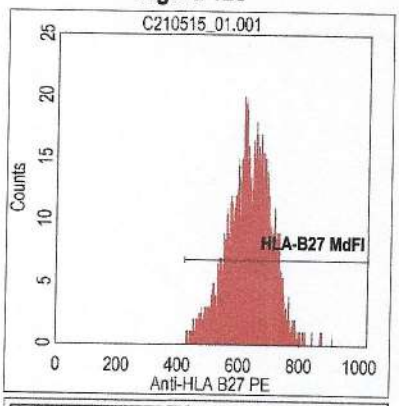


Histogram Statistics
File: C010615_01.001
Log Data Units: Channel Values
Acquisition Date: 01-Jan-70
Gate: T-Lymphs
X Parameter: Anti-HLA B27 PE (Log)

Marker	Median
All	616.00
Sample MdFI	616.00

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 positiva que está dentro de la zona indeterminada

Figura 12c



Histogram Statistics
File: C210515_01.001
Log Data Units: Channel Values
Acquisition Date: 22-May-15
Gate: T-Lymphs
X Parameter: Anti-HLA B27 PE (Log)

Marker	Median
All	633.00
Sample MdFI	633.00

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 positiva

- **Figura 12a:** histograma de una muestra HLA-B27 negativa
- **Figura 12b**: histograma de una muestra positiva HLA–B27 que está dentro de la zona indeterminada
- **Figura 12c**: histograma de una muestra positiva HLA–B27

Estos gráficos representativos se han obtenido mediante un lote de reactivo con un determinante de 602 y una zona indeterminada de 575 a 624.
Nota: El determinante y la zona indeterminada son específicos de un lote concreto de reactivo DuraClone B27 y pueden presentar modificaciones en diferentes lotes del reactivo.

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

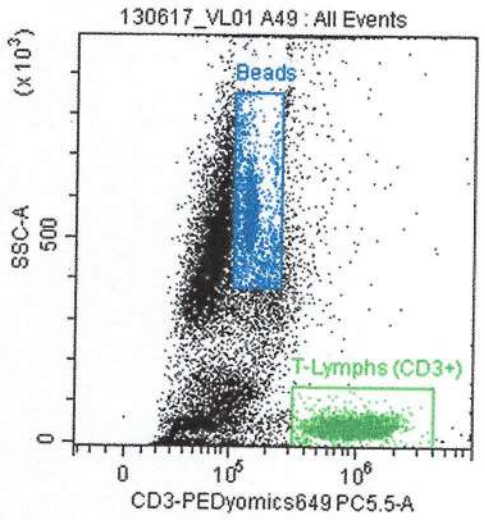
Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

Para los citómetros de flujo DxFLEX

1. Encienda el citómetro y abra el software CytExpert para DxFLEX.
2. A continuación se indican los filtros fluorescentes mencionados en las secciones posteriores:
   - FL1 (canal FITC): 525 ± 40 nm
   - FL2 (canal PE): 585 ± 42 nm
   - FL4 (canal PC5.5): 690 ± 50 nm
3. Cree un experimento y las siguientes plantillas. Dibuje dos diagramas de dispersión como en la Figura 13 y la Figura 14 y cuatro histogramas como en la Figura 15, la Figura 16, la Figura 17 y la Figura 18 (18a/18b/18c).
4. Ajuste la configuración de ganancia.
   a. Figura 13 (trazado de puntos): gráfico de canal PC 5.5 log frente a SSC-lineal.
      1) Ajuste la configuración de ganancia de la dispersión lateral y el canal PC5.5 para adquirir linfocitos T y esferas.
      2) Asigne a las regiones los nombres "T-Lymphs (CD3+)" (linfocitos T [CD3+]) y "Beads" (esferas), respectivamente.
      3) Asegúrese de que se adquieran las poblaciones de esferas y linfocitos, y que se puedan visualizar de manera separada del fondo.
   b. Figura 14 (trazado de puntos): gráfico de canal FITC log frente a canal PE log.
      1) Aplique la ventana de selección "Beads" (Esferas) de la Figura 13 para obtener las esferas fluorescentes de referencia. Estas esferas tienen una intensidad de fluorescencia alta en el canal FITC y el canal PE
      2) Asigne a la región el nombre "Ref. Beads" (Esferas de referencia).
   c. Figura 15 (histograma): gráfico de canal FITC log frente a recuentos.
      1) Aplique la ventana de selección "Ref. Beads" (Esferas de referencia) de la Figura 14.
      2) Trace un marcador de región y ajuste la configuración de ganancia del canal FITC para colocar las esferas en esta región y así conseguir una MdFI final de Ref. Beads (Esferas de referencia) de **185 547 ± 4883.**
   d. Figura 16 (histograma): gráfico de canal PE log frente a recuentos.
      1) Aplique la ventana de selección "Ref. Beads" (Esferas de referencia) de la Figura 14.
      2) Trace un marcador de región y ajuste la configuración de ganancia del canal PE para colocar las esferas en esta región y así conseguir una MdFI final de Ref. Beads (Esferas de referencia) de **185547 ± 4883.**
   e. Figura 17 (histograma): gráfico de canal PC 5.5 log frente a recuentos.
      1) Aplique la ventana de selección "Ref. Beads" (Esferas de referencia) de la Figura 14.
      2) Trace un marcador de región y ajuste la configuración de ganancia del canal PC5.5 para colocar las esferas en esta región y así conseguir una MdFI final de Ref. Beads (Esferas de referencia) de **146 484 ± 4883.**
   f. Figura 18 (histograma): gráfico de canal PE log frente a recuentos.
      1) Aplique la ventana de selección "T-Lymphs (CD3+)" (linfocitos T [CD3+]) de la Figura 13.
5. Establezca la condición Detener y guardar en 3000 Ref. Beads (Esferas de referencia) para el histograma de la Figura 16. Se recomienda procesar la muestra con un caudal lento.
6. Configure la opción Discriminator (Discriminador) en el canal PC 5.5-A log. Ajuste el límite superior del discriminador de manera que se minimicen los residuos.
7. Seleccione Record (Registro) para guardar los datos y adquirir 3000 eventos de Ref. Beads (Esferas de referencia).

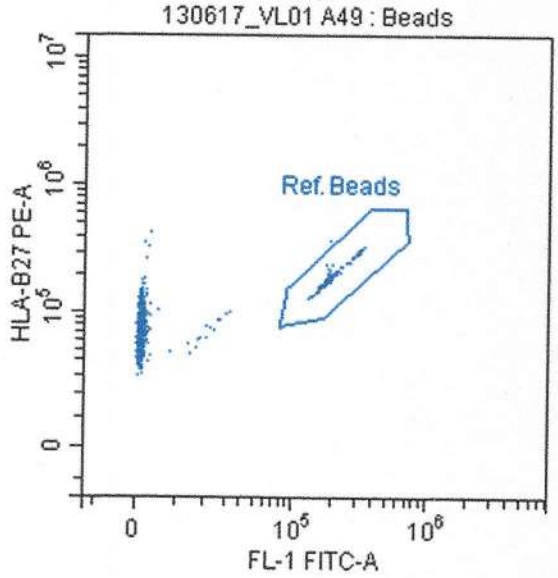
Nota: Cuando utilice el citómetro de flujo DxFLEX con el Cargador automático para la adquisición de múltiples muestras, asegúrese de que las esferas de referencia están dentro del intervalo de referencia recomendado. La función de registro automático no permite al usuario ajustar la ganancia si es necesario.

Figura 13



Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 dentro de la zona indeterminada

Figura 14



Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 dentro de la zona indeterminada

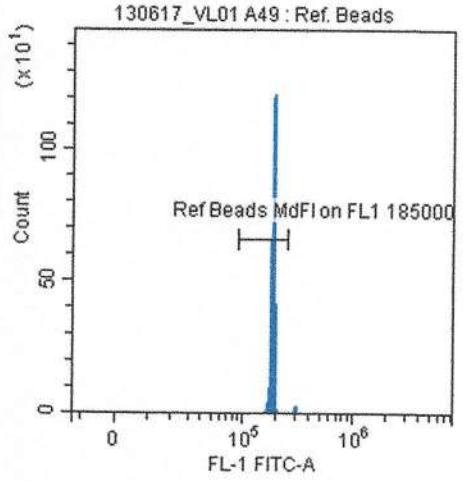
- **Figura 13 (trazado de puntos):** fluorescencia CD3 PE-Dy649 (canal PC 5.5) frente a dispersión lateral (SSC: escala lineal) para obtener linfocitos T CD3+ y esferas.
- **Figura 14 (trazado de puntos)**: canal FITC frente al canal PE con la ventana de selección Beads (Esferas) de la Figura 13 aplicada para obtener diferentes esferas fluorescentes de referencia.

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

IF-2020-53102040-APN-DCA#ANMAT

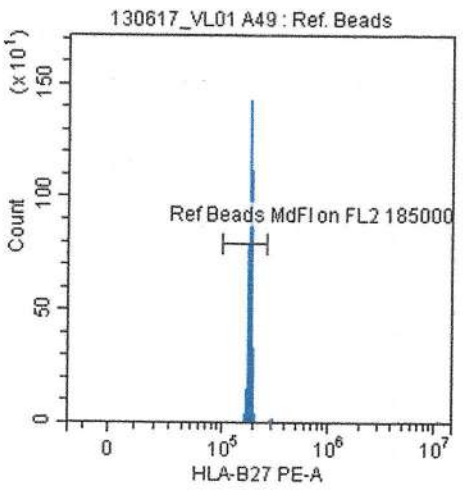
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

Figura 15



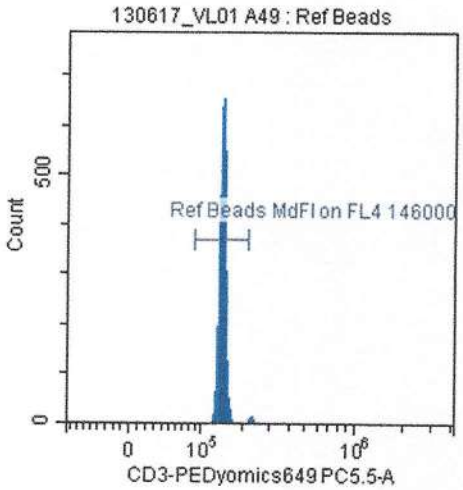
Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 dentro de la zona indeterminada

Figura 16



Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 dentro de la zona indeterminada

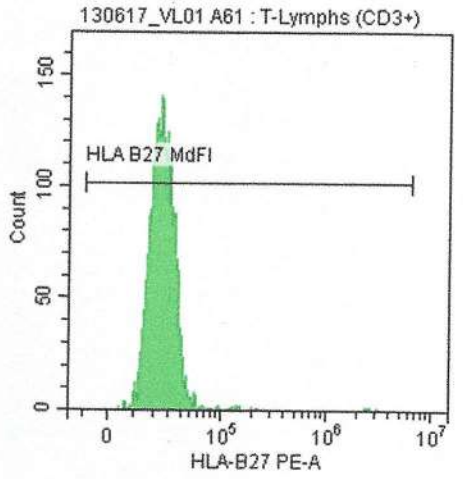
Figura 17



Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 dentro de la zona indeterminada

■ **Figura 15, 16 y 17**: histograma que representa "Ref beads" (Esferas de referencia) en los canales FITC, PE y PC 5.5, respectivamente.

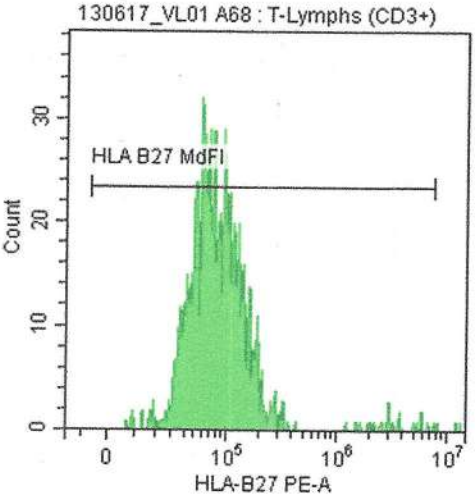
Figura 18a



HLA-B27 MdFI = 24441.6

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa

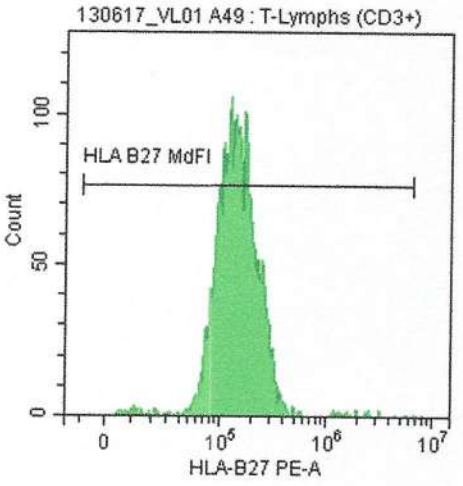
Figura 18b



HLA-B27 MdFI =76222.1

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 negativa que está dentro de la zona indeterminada

Figura 18c



HLA-B27 MdFI = 140055.5

Este gráfico se ha generado con una muestra HLA-B27 positiva

■ **Figura 18a:** histograma de una muestra HLA-B27 negativa
■ **Figura 18b:** histograma de una muestra negativa HLA-B27 que está dentro de la zona indeterminada
■ **Figura 18c:** histograma de una muestra positiva HLA–B27

Estos gráficos representativos se han obtenido mediante un lote de reactivo con un determinante de 86 618 y una zona indeterminada de 68 376 a 10 4551.
Nota: El determinante y la zona indeterminada son específicos de un lote concreto de reactivo DuraClone B27 y pueden presentar modificaciones en diferentes lotes del reactivo.

Dr. EDGARDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

Gabriela A. Civiano
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

Interpretación de los resultados

- Para obtener los valores del determinante y de la zona indeterminada, consulte la etiqueta de la bolsa.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

La información sobre el rendimiento se ha obtenido mediante el uso de muestras de sangre recogidas en un período de 48 horas tras la punción venosa. Las muestras se recogieron según las instrucciones del fabricante para conocer el volumen mínimo de sangre que se debe recoger en los tubos de ensayo que contienen K_2EDTA o K_3EDTA y se almacenaron a una temperatura entre 18 y 25 °C.

El ensayo se llevó a cabo de conformidad con el protocolo descrito en la sección anterior relativa al protocolo del ensayo. Las muestras se analizaron en un período de 24 horas tras la inmunotinción y el procesamiento.

ESPECIFICIDAD

El estudio de especificidad de todos los anticuerpos utilizados en este reactivo se ha llevado a cabo en relación con sus antígenos respectivos.

La especificidad del clon UCHT-1 hacia el antígeno CD3 ha sido estudiada por JJ van Dongen *et al.*[12] La especificidad de los clones ABC-m3 y FD705 hacia el antígeno HLA-B27 ha sido estudiada por Joseph A. Trapani et al. y Wilfried H. B. M. Levering *et al.*[1, 13] La especificidad del clon BB 7.1 hacia el antígeno HLA-B7 ha sido estudiada por Naoto Yoshino, *et al.*[14]

PRECISIÓN, SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL REACTIVO DURACLONE B27

Rendimiento frente al kit BD HLA-B27 y PCR molecular

A continuación, se muestran los resultados comparativos de la tipificación de HLA-B27 mediante el reactivo DuraClone B27 en los citómetros de flujo BD FACSCalibur™, BD FACSCanto™ II, Navios, Cytomics FC 500 y DxFLEX en 3 lotes del reactivo con las pruebas desarrolladas en laboratorio de kit BD HLA-B27 (ref. 340183) y PCR molecular como predicados. El reactivo DuraClone B27 supera el 95 % de concordancia con los resultados obtenidos con el kit BD HLA-B27 y PCR en todos los instrumentos. El estudio se realizó en un total de 2340 puntos de datos (156 muestras clínicas X 5 instrumentos X 3 lotes de reactivo DuraClone B27) respecto a PCR y en un total de 2325 puntos de datos (155 muestras clínicas X 5 instrumentos X 3 lotes de reactivo DuraClone B27) respecto al kit BD HLA-B27. Estos resultados se han calculado sin utilizar la zona indeterminada. Los datos se analizaron mediante instrumentos y lotes, y se comunican la concordancia, sensibilidad y especificidad mínimas obtenidas. Consulte la Tabla 1.

Tabla 1: concordancia, sensibilidad y especificidad de DuraClone B27 respecto al kit BD HLA-B27

Rendimiento del reactivo DuraClone B27 (n = 155)	Predicado: Kit BD HLA-B27	Predicado: PCR
Concordancia	98 %	99 %
Especificidad	98 %	98 %
Sensibilidad	98 %	100%

Si la mediana de intensidades de fluorescencia de HLA-B27 del resultado está dentro de la zona indeterminada, se debe confirmar la tipificación de HLA-B27 de la muestra mediante métodos alternativos, como la PCR.

Si la mediana de intensidades de fluorescencia de HLA-B27 del resultado es mayor que (>) el límite superior de la zona indeterminada, entonces la muestra es **positiva.**

Si la mediana de intensidades de fluorescencia de HLA-B27 del resultado es menor que (<) el límite inferior de la zona indeterminada, entonces la muestra es **negativa.**

Tabla 2: intervalos de confianza del 95 % en relación a la PCR indicada por el instrumento

Rendimiento del reactivo DuraClone B27	Intervalo de confianza inferior al 95 %	Intervalo de confianza superior al 95 %
Navios	99,2 %	100,0 %
Cytomics FC500	98,8 %	100,0 %
BD FACSCalibur™	98,5 %	99,9 %
BD FACSCanto™ II	98,5 %	99,9 %
DxFLEX	98,8 %	100,0 %

Rendimiento frente a IOTest HLA-B27-FITC/ HLA-B7-PE

Estos resultados se basan en un estudio que ha utilizado el reactivo DuraClone B27 en el citómetro de flujo Navios. El estudio utilizó IOTest HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE (ref.: A07739) como predicado. Estos resultados se han calculado sin utilizar la zona indeterminada. El reactivo DuraClone B27 supera el 95 % de concordancia con el método predicado.

PRECISIÓN

Repetibilidad

La precisión en un instrumento (dentro del mismo instrumento) de BD FACSCalibur™, BD FACSCanto™ II, Navios, Cytomics 500 y DxFLEX se estimó con un mínimo de 4 muestras por lote, que eran positivas a la expresión del antígeno HLA-B27 en 3 lotes de reactivo DuraClone B27. Se calculó el CV de los valores de la MdFI de las poblaciones de HLA-B27-PE con tinción para cada una de las muestras. La precisión calculada de cada uno de los instrumentos se representa en la Tabla 3. Se obtuvo un CV < 10 % para los valores de la MdFI de HLA-B27 de todas las muestras en los cinco instrumentos.

Tabla 3: datos de precisión dentro del mismo instrumento de DuraClone B27

	CV (%) de MdFI de DuraClone B27				
	Cytomics FC 500	Navios	DxFLEX	BD FACSCalibur™	BD FACSCanto™ II
Muestra 1	9,54	4,15	5,51	1,43	1,09
Muestra 2	4,34	3,14	4,06	1,33	0,79
Muestra 3	4,90	3,00	3,00	0,65	0,66
Muestra 4	4,89	5,69	5,15	1,05	0,77

Reproducibilidad

Dos operadores probaron la reproducibilidad en 3 lotes de reactivos, con 2 procesos al día y 2 repeticiones por proceso, 3 veces durante 20 días. Se ha realizado la evaluación en una estirpe celular CA46 en un citómetro de flujo Navios, un FC500, un BD FACSCalibur™, un BD FACSCanto™ II y dos DxFLEX. Debido a la semejanza en las escalas MdFI, se han agrupado los citómetros de flujo Navios y Cytomics FC500; BD FACSCalibur™ y BD FACSCanto™ II. El CV de repetibilidad en toda la variabilidad es < 20 % para MdFI de HLA-B27.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA Y EDAD DE LA MUESTRA

Se ha realizado un estudio en el citómetro de flujo Navios en un total de 62 muestras de 3 lotes de reactivo para comprobar el rendimiento del reactivo DuraClone B27 en la muestra envejecida y la estabilidad de la muestra procesada.

Se calculó la deriva en la intensidad de la expresión de HLA-B27, así como los intervalos de confianza superior e inferior del 95 % para la muestra envejecida (hasta 48 horas a 18-25 °C) y la muestra preparada (hasta 24 horas a 2-8 °C) en comparación con el Control (muestra de menos de 6 horas de antigüedad y menos de 2 horas de muestra preparada a 18-25 °C). Durante este estudio, las muestras de sangre se almacenaron a una temperatura de 18-25 °C, en un lugar protegido de la exposición directa a la luz, antes de la tinción. Las muestras procesadas se almacenaron a una temperatura entre 2-8 °C en un lugar protegido de la exposición directa a la luz durante un máximo de 24 horas. La deriva total en MdFI fue inferior al 12,5 % en las muestras envejecidas en comparación con una muestra nueva. Por consiguiente, se puede realizar la tinción de muestras de sangre hasta 48 horas después de la punción venosa con el reactivo DuraClone B27, y pueden adquirirse muestras teñidas hasta 24 horas después de la tinción, almacenándolas a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C y protegiéndolas de la exposición directa a la luz.

LIMITACIONES

1. El reactivo DuraClone B27 solamente se ha validado con sangre completa tratada con K_2EDTA y K_3EDTA.
2. El usuario debe responsabilizarse de garantizar que el citómetro de flujo esté calibrado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
3. Es importante que los ajustes de voltaje estén configurados para colocar las esferas fluorescentes de referencia según se describe en la sección Flow Cytometer Acquisition and Analysis (Adquisición y análisis del citómetro de flujo) para citómetros de flujo Navios y Cytomics FC 500, y en Sample Acquisition and Analysis (Adquisición y análisis de muestras) para los citómetros de flujo Navios, Cytomics FC 500, BD FACSCanto™ II y FACSCalibur™. Se debe comprobar visualmente la ventana de selección $CD3^+$ para garantizar una selección de linfocitos T adecuada.
4. El resultado de la prueba de HLA-B27 no indica la presencia o ausencia de una enfermedad. Para la determinación de un diagnóstico, el médico debe considerar detenidamente la expresión de HLA-B27 junto con la sintomatología y la historia clínica del paciente.[7]
5. Los anticuerpos HLA-B27 presentan reacción cruzada con muchos otros antígenos B, especialmente con HLA-B7[1]. Esta reactividad cruzada con otros antígenos B puede dar lugar a resultados falsos positivos.
6. No se ha observado ninguna interferencia debido a interferencias exógenas, como los fármacos comunes (paracetamol) y la extracción insuficiente (volumen de sangre inferior al recomendado) e interferencias endógenas, como el colesterol y los triglicéridos. Sin embargo, las interferencias endógenas, como la bilirrubina, han provocado la reducción de la intensidad (MdFI) de la muestra en más de un 20 %. Estas interferencias pueden afectar al rendimiento del ensayo. No se deben usar sustancias lipémicas o esotéricas (sustancias o

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
SECKMAN COULTER ARG. S.A.

IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

moléculas muy poco frecuentes que no se utilizan en las muestras habituales de los laboratorios clínicos, como alérgenos y toxinas) en este ensayo.

7. Las muestras de sangre envejecidas hasta 48 horas después de la punción venosa mostraron una disminución de la mediana de intensidades de fluorescencia del 18 % conforme al cálculo del intervalo de confianza inferior del 95 %. Las muestras positivas cercanas al límite superior de la zona indeterminada pueden estar dentro de la zona indeterminada.
8. No se han analizado muestras hemolizadas o visiblemente coaguladas y no se deben utilizar en este ensayo.
9. La presencia de la población de duplicados de esferas en el gráfico de canal PC 5.5 log frente a SSC-lineal no afectará a los resultados.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

1. Si la población de linfocitos CD3+ no se muestra o no esta clara en el trazado de puntos de fluorescencia CD3 PE-Dy649 frente a dispersión lateral:
   a. Configuración del instrumento:
      - Asegúrese de que el instrumento ha superado la calificación, según la recomendación del fabricante.
      - Asegúrese de que el canal de fluorescencia CD3 PE-Dy649 está controlado y aumente los parámetros PMT o Gain (ganancia) para visualizar la población.
      - Asegúrese de que el discriminador o el umbral de CD3 PE-Dy649 no está cortando la población de esferas.
      - Asegúrese de que la compensación está establecida en cero.
      - Asegúrese de que los parámetros SSC PMT o Gain (ganancia) están ajustados de forma adecuada para visualizar las poblaciones de linfocitos y esferas según se muestra en las figuras.
   b. Calidad de la muestra
      - Asegúrese de que la edad de la muestra es aceptable (consulte la extracción de muestras en la página 2).
      - Asegúrese de que la preparación de la muestra y la lisis son las esperadas. En caso contrario, prepare una muestra nueva.
   c. Reactivo
      - Asegúrese de que el reactivo no ha caducado y se ha almacenado correctamente.
2. Si la población de esferas no se muestra o no está clara en el trazado de puntos FL1 frente a FL2:
   a. Asegúrese de que el gráfico CD3 PE-Dy649 frente a dispersión lateral es el esperado. En caso contrario, siga los pasos de la solución de problemas según se indica.
   b. Asegúrese de que los parámetros PMT o Gain (ganancia) de los canales FL1 y FL2 están ajustados de forma adecuada para visualizar la población de esferas.
3. Si la población de esferas no se muestra en los histogramas de FL1, FL2 y FL3/FL4:
   a. Asegúrese de que los gráficos CD3 PE Dy-649 frente a dispersión lateral, y FL1 frente a FL2 son los esperados. En caso contrario, siga los pasos de la solución de problemas según se indica.
   b. Asegúrese de que la ventana de selección "Beads" (esferas) de los canales FL1 y FL2 está ajustada de forma adecuada y que engloba la población de esferas.
4. Si la población HLA-B27 no se muestra en FL2 o hay un doble pico en el canal FL2:
   a. Asegúrese de que los gráficos CD3 PE Dy-649 frente a dispersión lateral, y FL1 frente a FL2 son los esperados. En caso contrario, siga los pasos de la solución de problemas según se indica.
   b. Asegúrese de que la opción "CD3+ T Cells" (Células CD3+ T) está seleccionada para recoger solamente linfocitos T.
5. La mediana de intensidades de las esferas de referencia se debe controlar para verificar que las esferas estén dentro del intervalo de referencia. Si el usuario observa un desvío de las esferas de referencia fuera del intervalo de referencia:
   a. Los valores de ganancia del canal respectivo se deben ajustar para hacer que las esferas de referencia estén dentro del intervalo de referencia.

REFERENCIAS

1. Wilfried H. B. M. Levering, Henk Wind, Kees Sintnicolaas, Herbert Hooijkaas y Jan W. Gratama. Flow Cytometric HLA-B27 Screening: Cross-Reactivity Patterns of Commercially Available Anti–HLA-B27 Monoclonal Antibodies With Other HLA-B Antigens. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 54B:28–38 (2003).
2. Michael J. Warzynski. HLA-B27 TESTING: MEAN CHANNELS, QC, AND SURVEYS. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 30:208–211 (1997).
3. Jenn C. Chen, Bruce H. Davis, Nancy C. Bigelow, Carole Ceckowski, JoAnne Robinson, Cynthia Sounart-Miscovich y Kame A. Steel. Flow Cytometric HLA-B27 Typing Using CD3 Gating and Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome (MESF) Quantitation. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 26:286-292 (1996).
4. P. S. Dhurandhar and U. Shankarkumar. HLA Association in Seronegative Spondyloarthritis Patients From Mumbai, India. Int J Hum Genet, 7(3): 235-239 (2007).
5. Michael T. Seipp, Maria Erali, Rae Lynn Wies, and Carl Wittwer. HLA-B27 Typing: Evaluation of an Allele-Specific PCR Melting Assay and Two Flow Cytometric
6. Antigen Assays. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 63B:10–15 (2005).
7. W.H.B.M. Levering, H. Wind, H. Hooijkaas, K. Sintnicolaas, B. Brando, J.W. Gratama. Flow cytometric screening for HLA-B27 on peripheral blood lymphocytes. J Biol Regul Homeost Agents 2003; 17: 241-6.
8. Johannes J.M.L. Hoffmann y Willy C.M. Janssen HLA-B27 phenotyping with flow cytometry: further improvement by multiple monoclonal antibodies. Clinical Chemistry 43:10, 1997.
9. Anne M. Ward and Afzal Nikaein. Comparison of Monoclonal Antibodies for Flow Cytometric Analysis of HLA-B27 Antigen. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 22:65-69 (1995).
10. Wendy M. Reynolds, Philip R. Evans, Andrew C. Lane, W. Martin Howell, Peter J. Wilson, Raymond Wong y John L. Smith Automated HLA-B27 Testing Using the FACSPrep/FACScan System. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 18: 109-1 15 (1994).
11. Wilfried Levering. External quality assessment in flow cytometry. Educational aspects and trends toward improvement. Doctoral Thesis.
12. Wilfried H.B.M. Levering, Rene van den Beemd, Jeroen G. teMarvelde, Wil A.M. van Beers, Herbert Hooijkaas, Kees Sintnicolaas y Jan W. Gratama. External Quality Assessment of Flow Cytometric HLA-B27 Typing. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 42:95–105 (2000).
13. JJ van Dongen, GW Krissansen, IL Wolvers-Tettero, WM Comans-Bitter, HJ Adriaansen, H Hooijkaas, ER van Wering and C Terhorst. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies (Blood) 71: 603-612 1988.
14. Joseph A. Trapani, Hilary A, Vaughan Rosemary L, Sparrow Brian D, Tait Ian F, C. McKenzie. Description of a mouse monoclonal anti-HLA-B27 antibody HLA-ABC-m3 (Human Immunology) 7:205-216 1983.
15. Naoto Yoshino, Yasushi Ami, Keiji Terao, Fumio Tashiro and Mitsuo Honda. Upgrading of flow cytometric analysis for absolute counts, cytokines and other antigenic molecules of Cynomolgus Monkeys (*Macacafascicularis*) by using anti human cross reactive antibodies. Ca. Anim. 49: 97-110 (2000).

DISPONIBILIDAD DEL PRODUCTO

Kit de reactivos DuraClone B27
REF B36862

BD FACSCanto™ II, BD FACSCalibur™, BD CaliBRITE™, CellQuest™ Pro y BD FACSDiva™ son marcas comerciales de Becton Dickinson and Company.

Para obtener información adicional o si el producto recibido presenta daños, llame al Servicio al cliente de Beckman Coulter en el 800-742-2345 (EE. UU. o Canadá) o póngase en contacto con su representante local de Beckman Coulter.

Puede consultar el glosario de símbolos en beckman.com/techdocs (Ref. C05838).

Beckman Coulter India Pvt. Ltd.
50-B, II Phase, Peenya Industrial Area
Peenya, Bangalore 560058, India

EC REP
IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France

Impreso en la India

© 2019 Beckman Coulter, Inc.
Todos los derechos reservados.

Historial de revisiones

Revisión 10.0, 10/2018

Se han realizado cambios en:

- Agregar nuevos idiomas
- PRECISIÓN, SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL REACTIVO DURACLONE B27
- SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Revisión 11.0, 10/2019

Se han realizado cambios en:

- Agregar nuevos idiomas
- Precauciones
- REQUISITOS DE LOS INSTRUMENTOS
- OBTENCIÓN DE MUESTRAS
- Protocolo de ensayo
- Figuras 13-18c
- Interpretación de los resultados
- ESPECIFICIDAD
- LIMITACIONES

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 Kit de reactivos

REF B39492 - 50 pruebas

IFU-B39492-3.0

CE BECKMAN COULTER

	Especificación de constituyente 1	Especificación de constituyente 2	Especificación de constituyente 3
Especificidad	CD3	CD4	CD8
Clon	UCHT1	RPA-T4	LT8
Inmunógeno	Timocitos humanos y linfocitos de sangre periférica de un paciente con leucemia de células de Sezary	Glicoproteína de superficie de células T CD4	Linfocitos de sangre periférica humana sana.
Isotipo	IgG1 κ	IgG1	IgG1
Reactividad	Humanos/chimpancés	Humanos/chimpancés	Humanos
Host	Ratón	Ratón	Ratón
Fluorocromo	PE-Dyomics649	Atto™488	R-ficoeritrina
Excitación λ	488 nm	488 nm	488 nm
Pico de emisión	676 nm	523 nm	575 nm

IVD

USO PREVISTO

El reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 es un colorante con inmunofluorescencia de tres colores para la identificación y la enumeración de linfocitos T colaboradores/inductores (CD4+), linfocitos T citotóxicos/supresores (CD8+) y linfocitos T totales (CD3+) combinado con un número preciso de esferas de recuento fluorescente para la determinación de recuentos absolutos de células T CD3+, CD4+ y CD8+. Este reactivo está concebido para análisis basados en citometría de flujo en muestras humanas de sangre completa.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El reactivo contiene anticuerpos marcados con fluorescencia que se unen a los antígenos CD3, CD4 y CD8 que se encuentran en la superficie de leucocitos en circulación. El antígeno CD3 es un complejo de, como mínimo, seis proteínas, conocido comúnmente como complejo receptor de células T (TCR). El anticuerpo utilizado en este reactivo se une a la cadena ε de 20 kDa de este complejo.[1] El antígeno CD4 es una proteína de 59 kDa que interactúa con las moléculas de Clase II del complejo de histocompatibilidad mayor y es el receptor principal del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).[2,3] El antígeno CD8 es un complejo formado por dos subunidades ligadas por disulfuro. El anticuerpo utilizado en este reactivo se une a la subunidad α de 32 kDa del complejo. CD8 interactúa con las moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor de Clase I.[2,3]

FUNDAMENTOS DE LA DETERMINACIÓN

El reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 está formado por anticuerpos monoclonales murinos que reconocen específicamente los antígenos superficiales de los leucocitos humanos CD3, CD4 y CD8. Cada uno de los anticuerpos monoclonales está marcado con un fluorocromo único.

Los subconjuntos de células específicas se tiñen si se agrega sangre al reactivo y cada anticuerpo monoclonal se une a las moléculas de determinantes de células en la superficie celular. A continuación, los porcentajes y recuentos del subconjunto de linfocitos se determinan mediante citometría de flujo.

El reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 también contiene un número preciso de esferas fluorescentes. Al combinarse con un volumen conocido de sangre, el reactivo proporciona la determinación de plataforma única de las concentraciones absolutas de células de los subconjuntos de linfocitos. El volumen de muestra analizada se puede determinar mediante la multiplicación del volumen total de muestra por la fracción de la población total de esferas detectada durante el análisis.

REACTIVOS

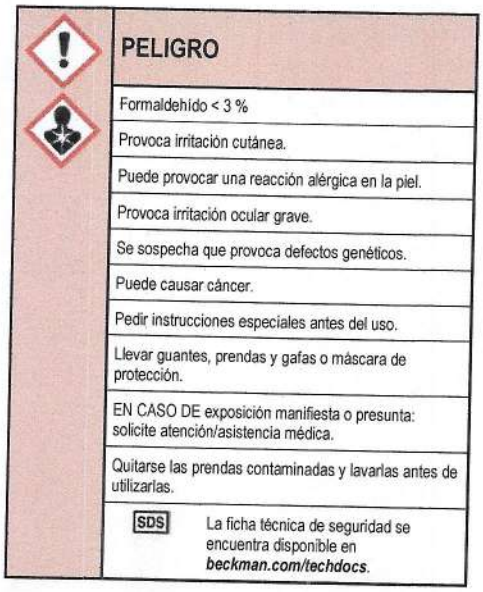
El kit de reactivos DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 contiene lo siguiente:

- 50 tubos de reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 listos para utilizar (1 tubo/prueba)
- 1 x 25 mL de solución DuraLyse

COMPOSICIÓN DEL REACTIVO

El reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 está formulado en solución salina tamponada de estabilización. Contiene Atto488™ – anticuerpo monoclonal anti-CD4 marcado, clon RPA-T4; R-ficoeritrina (PE) – anticuerpo monoclonal anti-CD8 marcado, clon LT8, y PE-Dyomics649 – anticuerpo monoclonal anti-CD3 marcado, clon UCHT1. En el marco del 8th International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (Octavo seminario internacional sobre antígenos de diferenciación de leucocitos humanos) se asignaron estas especificidades a los anticuerpos monoclonales que se utilizan en el reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8.[4] El reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 incluye un número preciso de esferas de recuento fluorescente para posibilitar la determinación de plataforma única de recuentos absolutos de células T CD4+, CD8+ y CD3+. El reactivo se proporciona en forma seca y se dispensa en tubos de 12 × 75 mm compatibles con citómetro de flujo listos para usar.

PRECAUCIONES



PELIGRO
Formaldehído < 3 %
Provoca irritación cutánea.
Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
Provoca irritación ocular grave.
Se sospecha que provoca defectos genéticos.
Puede causar cáncer.
Pedir instrucciones especiales antes del uso.
Llevar guantes, prendas y gafas o máscara de protección.
EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: solicite atención/asistencia médica.
Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de utilizarlas.
SDS La ficha técnica de seguridad se encuentra disponible en ***beckman.com/techdocs***.

1. No utilice reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
2. Para evitar la degradación del reactivo, reduzca al mínimo la exposición a la luz.
3. Todas las muestras de sangre se consideran un posible riesgo biológico. Manipúlelas como si pudieran transmitir infecciones y deséchelas con la debida precaución de conformidad con la normativa gubernamental y regional aplicable.
4. Respete las prácticas de laboratorio recomendadas al manipular el reactivo.
5. La adición del volumen preciso de sangre es fundamental para la obtención de resultados precisos. Utilice una pipeta calibrada y utilícela de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
6. El reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 se proporciona en forma seca. Se recomienda encarecidamente la agitación adecuada en el vórtex tras la adición de la muestra de sangre para garantizar la solubilización del reactivo.
7. Los tubos de reactivo y las muestras deben eliminarse según la normativa gubernamental y regional pertinente.
8. Los materiales del envase deben eliminarse según la normativa regional pertinente.
9. La solución DuraLyse contiene dietilenglicol y formaldehído. El formaldehído es un carcinógeno potencial que irrita los ojos y la piel. La ingestión de dietilenglicol puede provocar la muerte.

ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Consulte la fecha de fabricación y la fecha de caducidad que aparecen en la etiqueta del envase. Almacene el reactivo entre 20 y 30 °C en un lugar seco protegido de la exposición directa a la luz. Una vez se hayan extraído los tubos necesarios, vuelva a sellar la bolsa que contiene en el interior los tubos restantes y la bolsita desecante. Una vez que se haya abierto la bolsa, utilice los reactivos en un periodo de 45 días.

SIGNOS DE DETERIORO

Si el envase está deteriorado, los datos obtenidos muestran una alteración del rendimiento, o se recibe un producto dañado, póngase en contacto con Beckman Coulter.

REQUISITOS DE LOS INSTRUMENTOS

El reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 está diseñado para su uso en citómetros de flujo equipados con láseres de 488 nm que pueden detectar dispersión frontal y dispersión lateral, y que son compatibles con los espectros de emisión de los fluorocromos utilizados en el reactivo.
Beckman Coulter recomienda el uso de citómetros de flujo BD FACSCalibur™ o DxFLEX* para este reactivo.

El instrumento debe calibrarse para la configuración de voltajes de tubo fotomultiplicador, compensación de fluorescencia y comprobación de la sensibilidad de los instrumentos según las directrices del fabricante.

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

Este reactivo se ha verificado y validado en las siguientes versiones del software BD:

- BD FACSCalibur™ con la versión 5.2.1. del software BD CellQuest™ Pro.

EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

Siga las directrices del fabricante de la probeta de extracción para conocer el volumen de sangre que se debe recoger.

La sangre anticoagulada (EDTA) se debe almacenar a una temperatura de 18-25 °C, y se debe procesar antes de que transcurran 24 horas tras la punción venosa. Las muestras procesadas se deben almacenar a una temperatura de 18-25 °C, y se deben proteger de la luz del sol y adquirir antes de que transcurran 48 horas tras el procesamiento.

PROCEDIMIENTO

MATERIALES SUMINISTRADOS

Kit de reactivos DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8
REF B39492

- Reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8
- Solución DuraLyse

MATERIALES NECESARIOS, PERO NO SUMINISTRADOS

Tubo de extracción de sangre que contenga K_2 EDTA o K_3 EDTA

Pipetas calibradas con puntas desechables

Mezclador de vórtex

Fluido envolvente

Esferas de calibración para citómetro de flujo (Beckman Coulter
Ref. B53230 para DxFLEX* y BD, n.º cat. 340486, para BD FACSCalibur™)

Protocolo de ensayo

NOTA: En todos los pasos, mantenga los tubos de reactivo protegidos de la luz. Tras lisar la muestra, se puede almacenar hasta 48 horas a 18-25 ºC antes de su procesamiento en el citómetro de flujo.

1. Asegúrese de que la muestra de sangre esté bien mezclada invirtiendo el tubo varias veces. Invierta la pipeta de 50 µL de la muestra de sangre a la parte inferior de un tubo de reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 de un solo uso.
2. Agite el tubo en el vórtex para asegurarse de que la sangre queda mezclada con el reactivo. Incube durante 30-40 minutos a una temperatura de 18-25 °C. Proteja el tubo de la exposición directa a la luz.
3. Añada 450 µl de la solución DuraLyse lista para usar al tubo y agítelo bien en el vórtex durante 6-8 segundos.
4. Incube los tubos en un lugar oscuro a una temperatura de 18-25 °C
durante 15-20 minutos.
5. Agite bien el tubo de la muestra en el vórtex a baja velocidad antes de la adquisición en el citómetro de flujo.

ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS para citómetros de flujo BD FACSCalibur™ y DxFLEX*

NOTA: este protocolo es específico de los citómetros de flujo BD FACSCalibur™ y DxFLEX* y presupone que el citómetro de flujo se ha configurado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, en el caso del citómetro de flujo DxFLEX, el instrumento debe pasar un control diario de alineación y fluidica con esferas CytoFLEX QC y el software CytExpert. Del mismo modo, en el caso del citómetro de flujo BD FACSCalibur™, el instrumento se debe configurar y calibrar con las esferas BD CaliBRITE™, según recomienda el fabricante.

Para los citómetros de flujo BD FACSCalibur™

1. Inicie el citómetro de flujo de acuerdo con las instrucciones del fabricante y calibre el instrumento de conformidad con el protocolo recomendado.
   a. El instrumento debe configurarse y calibrarse utilizando esferas CaliBRITE™.
2. La compensación se debe ajustar antes de procesar las muestras preparadas.
   a. Deben utilizarse los ajustes CaliBRITE.
3. Dibuje tres trazados de puntos (Vista 1 a Vista 3).
   a. **Vista 1**:Anti-CD3 – PE-Dyomics649 (FL-3) vs. dispersión lateral (escala lineal): para seleccionar la población CD3+.
   b. **Vista 2:** Anti-CD4 - Atto488 (FL-1) vs. Anti-CD8 - PE (FL-2): utilice la ventana de selección CD3+ para capturar eventos de CD4+ y CD8+.
   c. **View 3:** Anti-CD4 - Atto488 vs. Anti-CD8 - PE: sin selección; para seleccionar la población de esferas.
4. Configure el umbral en el canal FL-3 (PE-Dyomics 649) para minimizar los residuos.
5. Configure 3000 eventos en la ventana de selección de esferas como criterio de detención de adquisición.
6. El recuento absoluto para cada tipo de célula se puede calcular mediante el uso de la ecuación siguiente (donde los valores de "Gated Cell Count" [Recuento de células seleccionadas] y los valores de "Gated Bead Count" [Recuento de esferas seleccionadas] se obtienen con el análisis del citómetro de flujo, y el valor de "Bead Count per test" [Recuento de esferas por prueba] se obtiene con el kit de prueba):

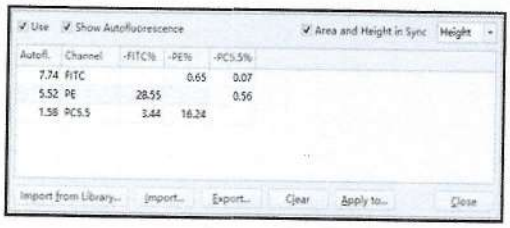
$$\text{Absolute Cell Count } /\mu L = \frac{(\text{Gated Cell Count}) \times (\text{Bead Count per test})}{(\text{Gated Bead Count}) \times (\text{Test Volume in } \mu L)}$$

Para los citómetros de flujo DxFLEX

1. Inicie el citómetro de flujo de acuerdo con las instrucciones del fabricante y calibre el instrumento de conformidad con el protocolo recomendado.
2. Cree un experimento en el software CytExpert en DxFLEX según los trazados de puntos siguientes.
   a. **Vista 4**:Anti-CD3 – PE-Dyomics649 (FL-3) vs. dispersión lateral (escala lineal): para seleccionar la población CD3+.
   b. **Vista 5:** Anti-CD4 - Atto488 (FL-1) vs. Anti-CD8 - PE (FL-2): utilice la ventana de selección CD3+ para capturar eventos de CD4+ y CD8+.
   c. **View 6:** Anti-CD4 - Atto488 vs. Anti-CD8 - PE: sin selección; para seleccionar la población de esferas.
3. Abra el ajuste de adquisición y haga clic en la pestaña recomendada o importe los ajustes de ganancia de la ejecución diaria del archivo de CC el día del experimento.
4. En la matriz del nuevo experimento, introduzca los valores de derrame y autofluorescencia proporcionados en la Figura 1. Ajuste la compensación de DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8, si es necesario.
5. Configure el umbral en el canal FL-3 (PE-Dyomics 649) para minimizar los residuos.
6. Configure 3000 eventos en la ventana de selección de esferas como criterio de detención de adquisición.
7. El recuento absoluto para cada tipo de célula se puede calcular mediante el uso de la ecuación siguiente (donde los valores de "Gated Cell Count" [Recuento de células seleccionadas] y los valores de "Gated Bead Count" [Recuento de esferas seleccionadas] se obtienen con el análisis del citómetro de flujo, y el valor de "Bead Count per test" [Recuento de esferas por prueba] se obtiene con el kit de prueba):

$$\text{Absolute Cell Count } /\mu L = \frac{(\text{Gated Cell Count}) \times (\text{Bead Count per test})}{(\text{Gated Bead Count}) \times (\text{Test Volume in } \mu L)}$$

Matriz de compensación para los citómetros de flujo DxFLEX:

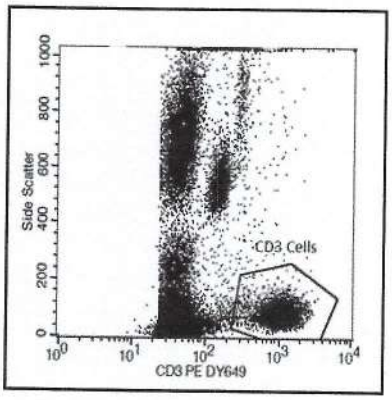


Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

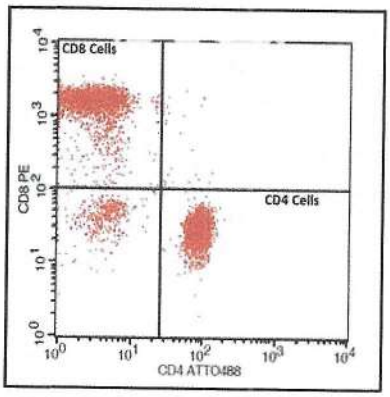
IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

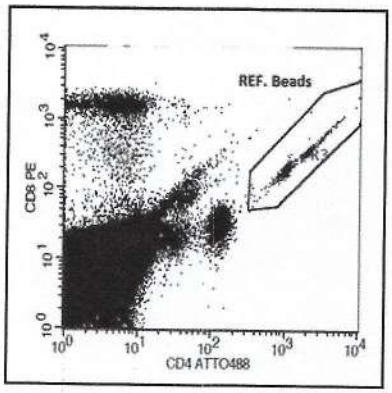
Vistas de trazado de puntos:
Vista 1: Anti-CD3 – PE-Dyomics649 (FL-3) vs. dispersión lateral (escala lineal)
Vista 2: Anti-CD4 - Atto488 (FL-1) vs. Anti-CD8 - PE (FL-2)
Vista 3: Anti-CD4 - Atto488 vs. Anti-CD8 - PE: Sin selección



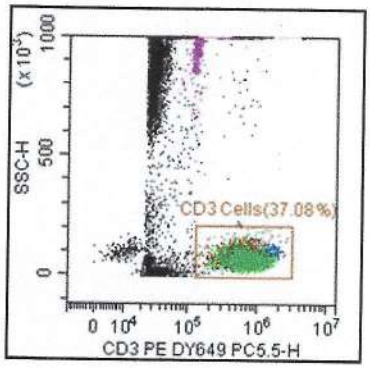
VISTA:1



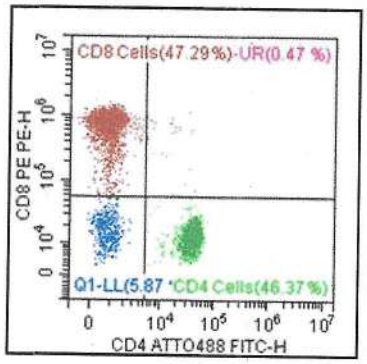
VISTA:2



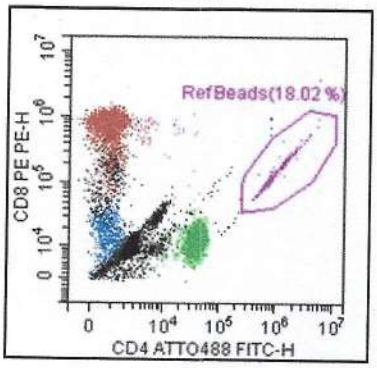
VISTA:3



VISTA:4



VISTA:5



VISTA:6

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

La información sobre el rendimiento se ha obtenido mediante el uso de muestras de sangre recogidas en un período de 24 horas tras la punción venosa. Las muestras se obtuvieron según las instrucciones del fabricante en tubos de extracción de sangre que contenían K_2EDTA o K_3EDTA y se almacenaron a una temperatura de 18-25 °C antes del procesamiento.

Los ensayos se llevaron a cabo de conformidad con el protocolo descrito en la sección anterior relativa al protocolo del ensayo. Las muestras preparadas se analizaron dentro de las 48 horas posteriores al procesamiento.

PRECISIÓN Y CORRELACIÓN DEL REACTIVO DURACLONE TRI T-STAT CD3/CD4/CD8

Se determinaron los recuentos absolutos de las poblaciones de CD3+, CD4+ y CD8+ y el porcentaje de la población seleccionada de CD4 y CD8 en muestras de sangre mediante el uso de reactivos DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 y BD TriTEST™ CD3/CD4/CD8 + TruCount™ (Ref.: 3402981) en citómetros de flujo DxFLEX y BD FACSCalibur. El análisis de regresión lineal Deming que se presenta en la Tabla 1 y en la Tabla 2 señala una equivalencia sustancial.

INTERVALOS DE REFERENCIA

Se llevó a cabo un estudio en el citómetro de flujo DxFLEX utilizando muestras de adultos hematológicamente sanos para determinar los intervalos de referencia para las poblaciones celulares de linfocitos T mediante el uso del reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8. Para el estudio, se inscribió en total a 138 voluntarios sanos de China. Los intervalos de referencia obtenidos se proporcionan en la Tabla 3.

LÍMITE DE BLANCO, LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de blanco que se establece para cada marcador de DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 en el citómetro de flujo DxFLEX es 18,7 células/µl, 1,1 células/µl y 1,1 células/µl para los recuentos absolutos de CD3+, CD4+ y CD8+, respectivamente. El límite de blanco que se establece para cada marcador de DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 en el citómetro de flujo BD FACSCalibur es 10,2 células/µl, 2,5 células/µl y 0,38 células/µl para los recuentos absolutos de CD3+, CD8+ y CD4+, respectivamente.

El límite de detección que se establece para cada marcador de DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 en el citómetro de flujo DxFLEX es 57,3 células/µl, 4,2 células/µl y 14,1 células/µl para los recuentos absolutos de CD3+, CD4+ y CD8+, respectivamente. El límite de detección que se establece para cada marcador de DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 en el citómetro de flujo BD FACSCalibur es 62,9 células/µl, 4,4 células/µl y 6,8 células/µl para los recuentos absolutos de CD3+, CD4+ y CD8+, respectivamente.

El límite de cuantificación que se establece para cada marcador de DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 en los citómetros de flujo DxFLEX y BD FACSCalibur es 158,2 células/µl, 13,9 células/µl y 23,9 células/µl para los recuentos celulares absolutos de CD3+, CD4+ y CD8+, respectivamente.

LINEALIDAD

La linealidad del ensayo se determinó mediante la comprobación de una serie de dilución de 11 puntos, con pruebas en cada nivel por triplicado. Se determinó la linealidad del ensayo en el citómetro de flujo DxFLEX (CD3+ (159-12 000 células/µl), CD4+ (42-7000 células/µl) y CD8+ (65-4000 células/µl) y BD FACSCalibur (CD3+ (159-13 000 células/µl), CD4+ (42-8000 células/µl) y CD8+ (65-3000 células/µl).

ESPECIFICIDAD

La especificidad antigénica de cada anticuerpo incluido en el reactivo DuraClone Tri T-STAT se ha confirmado de forma experimental.

Los anticuerpos monoclonales CD3, CD4 y CD8 utilizados en el reactivo se asignan a las agrupaciones de diferenciación CD3, CD4 y CD8 respectivamente según el 1st international workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigen (Primer seminario internacional sobre antígenos de diferenciación de leucocitos humanos) (HLDA) organizado en Paris, Francia, el año 1982.[4] El clon de anticuerpo monoclonal UCHT1 de CD3 reacciona específicamente con la cadena ε del complejo CD3.[5] El clon RPA-T4 se une al dominio D1 (epítopos CDR1 y CDR3) del antígeno CD4 y reacciona con aproximadamente un 80 % de timocitos y un 45 % de linfocitos de sangre periférica.[1]

Se llevó a cabo un estudio (análisis de competencia de fijación a receptores) en el citómetro de flujo DxFLEX en un total de 3 muestras de sangre completa mediante el análisis de anticuerpos no marcados específicos y no específicos para investigar la

DR. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

especificidad de los anticuerpos utilizados en el análisis. Se observó una disminución de la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) en todas las especificidades en las que se añadió un anticuerpo no marcado específico. No se observó una disminución de la MFI en ninguna de las especificidades en las que se añadió un anticuerpo no marcado no específico. La especificidad antigénica de cada anticuerpo incluido en el reactivo DuraCloneTri T-STAT CD3/CD4/CD8 se ha confirmado de forma experimental. Por lo tanto, los anticuerpos utilizados en la fabricación del reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 son todos específicos de la población diana prevista.

PRECISIÓN

Repetibilidad

Se analizó la precisión intrainstrumento en dos instrumentos utilizando un mínimo de 5 muestras por lote de reactivo por operador. Se analizó un mínimo de 2 muestras de control con bajo nivel de CD4 (IMMUNO-Trol Low Control) con recuentos absolutos de CD4+ < 300 células/µl en 3 operadores y en 3 lotes de reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8. La precisión calculada dentro de cada instrumento se muestra en la Tabla 3. Se obtuvo un CV de ≤ 10 % para el recuento celular < 300, y de ≤ 5 % para el recuento celular > 300 para los recuentos absolutos de poblaciones de CD3+, CD4+, CD8+ y de poblaciones de %CD4 y %CD8 para todas las muestras, dentro de cada uno de los 2 instrumentos. Estos resultados se resumen en la Tabla 4.

Reproducibilidad

Dos operadores durante 3 días analizaron la reproducibilidad en 3 lotes de reactivos, con 2 ciclos por día y 2 repeticiones por ciclo. La evaluación se llevó a cabo en un control IMMUNO-TROL Low Cells y en un control IMMUNO-TROL Cells en 2 instrumentos BD FACSCalibur™ y 2 DxFLEX*. El CV de repetibilidad de todas las fuentes de variabilidad es < 15 % para los recuentos absolutos de poblaciones de CD3+, CD4+, CD8+ y de poblaciones de %CD4 y %CD8. Estos resultados se resumen en la Tabla 5.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA Y EDAD DE LA MUESTRA

Se llevó a cabo un estudio en el citómetro de flujo DxFLEX utilizando 24 muestras y 3 lotes de reactivo para investigar el rendimiento del reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 en muestras de sangre antiguas y para evaluar la estabilidad de las muestras procesadas. Durante este estudio, las muestras de sangre se almacenaron a una temperatura de 18-25 °C, en un lugar protegido de la exposición directa a la luz, antes de la tinción. Las muestras procesadas se almacenaron a una temperatura de 18-25 °C, en un lugar protegido de la exposición directa a la luz, antes del análisis por citometría de flujo. La variación total en los recuentos absolutos de las poblaciones de CD3+, CD4+, CD8+ y de las poblaciones de %CD4 y %CD8 fue ≤ 10 % para las muestras antiguas en comparación con las muestras nuevas. Los resultados de este estudio demuestran que las muestras de sangre pueden usarse para la tinción con el reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 durante hasta 24 horas tras la punción venosa y que las muestras preparadas pueden analizarse hasta 48 horas cuando las muestras se han almacenado a una temperatura de 18-25 °C, en un lugar protegido de la exposición directa a la luz.

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A.
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

Tabla 1. Correlación del reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 en comparación con BD TriTEST™ (citómetro de flujo DxFLEX)

BD Tritest frente a Duraclone Tri T-STAT (en el citómetro de flujo DxFLEX)						
Lote de reactivo 1	**n**	**CD3+ total**	**CD4+**	**CD8+**	**%CD4+**	**%CD8+**
Correlación	149	0,9689	0,9835	0,9713	0,9924	0,985
Intersección	149	95,679	8,1662	17,834	–0,00531	–0,0011
Pendiente	149	0,9311	0,9192	0,9554	0,9465	0,974
LC inferior	149	0,893	0,892	0,918	0,9275	0,9431
LC superior	149	0,9707	0,9472	0,9943	0,9658	0,9985

Lote de reactivo 2	**n**	**CD3+ total**	**CD4+**	**CD8+**	**%CD4+**	**%CD8+**
Correlación	152	0,9789	0,9872	0,9809	0,9943	0,9848
Intersección	152	29,9575	–2,0451	–0,1442	–0,009	–58
Pendiente	152	0,9791	0,9615	0,9935	0,9813	0,9992
LC inferior	152	0,9466	0,9869	0,9622	0,9645	0,9712
LC superior	152	1,0126	0,9869	1,0258	0,9984	1,028

Lote de reactivo 3	**n**	**CD3+ total**	**CD4+**	**CD8+**	**%CD4+**	**%CD8+**
Correlación	150	0,9701	0,9796	0,9764	0,9918	0,9846
Intersección	150	38,6831	–0,2909	–7,1664	0,009	–0,0058
Pendiente	150	0,9948	0,9593	1,01	0,9598	0,9814
LC inferior	150	0,9552	0,9278	0,9744	0,9399	0,9535
LC superior	150	1,0361	0,9918	1,0469	0,9801	1,0102

Tabla 2. Correlación del reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 en comparación con BD TriTEST™ (citómetro de flujo BD FACSCalibur™)

BD Tritest frente a Duraclone Tri T-STAT (en el citómetro de flujo BD FACSCalibur)						
Lote de reactivo 1	**n**	**CD3+ total**	**CD4+**	**CD8+**	**%CD4+**	**%CD8+**
Correlación	149	0,9741	0,9843	0,9774	0,9944	0,9895
Intersección	149	77,5585	0,148	23,8943	–0,0073	–0,0136
Pendiente	149	0,8836	0,9025	0,8887	0,9774	0,9955
LC inferior	149	0,8507	0,8765	0,8579	0,9606	0,9721
LC superior	149	0,9176	0,9292	0,9206	0,9944	1,0195

Lote de reactivo 2	**n**	**CD3+ total**	**CD4+**	**CD8+**	**%CD4+**	**%CD8+**
Correlación	152	0,9825	0,9903	0,9831	0,995	0,9919
Intersección	152	34,523	–1,5656	0,836	–0,0077	–0,0197
Pendiente	152	0,9013	0,9064	0,9125	0,9942	1,0171
LC inferior	152	0,874	0,8861	0,8855	0,9783	0,9963
LC superior	152	0,9293	0,9272	0,9403	1,0104	1,0384

Lote de reactivo 3	**n**	**CD3+ total**	**CD4+**	**CD8+**	**%CD4+**	**%CD8+**
Correlación	150	0,9807	0,9894	0,9824	0,9945	0,9856
Intersección	150	76,5398	–1,9326	26,4111	–0,0095	–0,0143
Pendiente	150	0,9057	0,9296	0,9042	0,9834	0,9938
LC inferior	150	0,8768	0,9077	0,8766	0,9667	0,9664
LC superior	150	0,9355	0,952	0,9325	1,0004	1,0219

Tabla 3. Intervalos Referencia.

Población celular de linfocitos T	**CD3+ células/µl**	**CD4+**		**CD8+**	
		Células/µL	**%**	**Células/µL**	**%**
Intervalo Referencia	938-2217	386-1168	31-68	203-1056	22-57

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

Gabriela A. Civiliano
Beckman Coulter Argentina S.A.
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

Tabla 4. Repetibilidad

% de CV de repetibilidad en muestras de sangre completa sana con diferentes operadores y lotes de reactivo								
	SC	Lote react.	Operario	%CD8+	%CD4	CD3+ células/µl	CD4+ células/µl	CD8+ células/µl
Citómetro de flujo DxFLEX	D1	Lote 1	OP1	1,332 %	1,074 %	4,441 %	4,497 %	4,962 %
		Lote 2	OP1	1,432 %	0,946 %	3,176 %	3,417 %	3,203 %
		Lote 3	OP1	2,747 %	2,793 %	3,115 %	4,868 %	4,216 %
		Lote 1	OP2	1,501 %	1,387 %	4,264 %	4,258 %	4,235 %
		Lote 2	OP2	1,825 %	1,264 %	2,173 %	2,703 %	2,375 %
		Lote 3	OP2	2,016 %	1,754 %	3,456 %	4,371 %	3,412 %
		Lote 1	OP3	1,473 %	0,803 %	4,357 %	4,602 %	4,702 %
		Lote 2	OP3	1,371 %	0,972 %	3,103 %	2,625 %	3,752 %
		Lote 3	OP3	1,645 %	1,534 %	2,935 %	3,834 %	2,620 %
	D2	Lote 1	OP1	2,658 %	1,325 %	2,243 %	2,584 %	3,402 %
		Lote 2	OP1	2,174 %	2,125 %	3,658 %	4,964 %	3,571 %
		Lote 3	OP1	3,401 %	1,211 %	3,974 %	4,735 %	3,109 %
		Lote 1	OP2	2,589 %	1,324 %	3,267 %	2,845 %	4,951 %
		Lote 2	OP2	2,766 %	1,262 %	2,867 %	3,259 %	3,920 %
		Lote 3	OP2	2,081 %	1,384 %	4,237 %	4,866 %	4,828 %
		Lote 1	OP3	2,048 %	1,154 %	4,849 %	4,988 %	4,584 %
		Lote 2	OP3	2,294 %	1,096 %	3,656 %	3,387 %	4,912 %
		Lote 3	OP3	2,683 %	1,258 %	3,689 %	4,511 %	2,814 %
	D3	Lote 1	OP1	1,600 %	1,170 %	4,849 %	4,984 %	4,964 %
		Lote 2	OP1	1,304 %	0,622 %	2,715 %	2,880 %	2,848 %
		Lote 3	OP1	1,588 %	1,388 %	4,115 %	4,203 %	4,544 %
		Lote 1	OP2	0,730 %	0,636 %	3,025 %	3,272 %	3,456 %
		Lote 2	OP2	1,365 %	1,007 %	4,499 %	4,927 %	4,958 %
		Lote 3	OP2	1,942 %	1,086 %	4,391 %	4,902 %	3,706 %
		Lote 1	OP3	1,982 %	1,006 %	3,710 %	3,367 %	4,963 %
		Lote 2	OP3	1,139 %	1,338 %	2,908 %	3,144 %	3,208 %
		Lote 3	OP3	1,546 %	0,932 %	2,281 %	2,607 %	1,898 %
Citómetro de flujo BD FACSCalibur™	D1	Lote 1	OP1	1,251 %	1,581 %	3,686 %	3,501 %	4,793 %
		Lote 2	OP1	1,205 %	2,045 %	3,409 %	3,494 %	4,674 %
		Lote 3	OP1	0,985 %	1,182 %	4,437 %	4,825 %	4,948 %
		Lote 1	OP2	2,061 %	1,844 %	3,490 %	4,752 %	3,120 %
		Lote 2	OP2	1,890 %	1,311 %	1,451 %	2,158 %	2,111 %
		Lote 3	OP2	1,719 %	1,404 %	2,843 %	4,363 %	2,005 %
		Lote 1	OP3	1,805 %	2,308 %	3,415 %	3,514 %	3,154 %
		Lote 2	OP3	1,726 %	1,435 %	3,856 %	4,096 %	4,448 %
		Lote 3	OP3	1,171 %	0,991 %	3,391 %	3,790 %	3,539 %
	D2	Lote 1	OP1	1,482 %	2,459 %	3,308 %	4,227 %	2,400 %
		Lote 2	OP1	1,511 %	2,410 %	2,117 %	2,614 %	3,170 %
		Lote 3	OP1	1,587 %	2,020 %	2,908 %	3,622 %	3,466 %
		Lote 1	OP2	1,172 %	1,247 %	2,791 %	2,371 %	3,501 %
		Lote 2	OP2	1,009 %	1,451 %	2,610 %	3,289 %	3,439 %
		Lote 3	OP2	1,489 %	2,111 %	3,601 %	4,044 %	3,937 %
		Lote 1	OP3	NA	NA	NA	NA	NA
		Lote 2	OP3	1,505 %	1,565 %	3,826 %	3,789 %	4,231 %
		Lote 3	OP3	1,588 %	2,027 %	3,900 %	4,023 %	4,546 %
	D3	Lote 1	OP1	1,172 %	1,247 %	2,791 %	2,371 %	3,501 %
		Lote 2	OP1	1,460 %	1,527 %	3,219 %	3,854 %	3,218 %
		Lote 3	OP1	1,596 %	1,636 %	3,492 %	3,532 %	3,625 %
		Lote 1	OP2	1,462 %	1,588 %	1,939 %	2,146 %	2,772 %
		Lote 2	OP2	2,165 %	2,240 %	3,361 %	4,207 %	4,111 %
		Lote 3	OP2	2,201 %	2,082 %	2,920 %	4,047 %	3,351 %

DR. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A.
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

		Lote 1	OP3	2,348 %	2,236 %	3,296 %	4,321 %	4,166 %
		Lote 2	OP3	2,672 %	3,143 %	3,568 %	4,392 %	4,185 %
		Lote 3	OP3	1,625 %	0,967 %	2,660 %	3,533 %	2,404 %

% de CV de repetibilidad en muestras de IMMUNO-TROL Low Control con diferentes operadores y lotes de reactivo

Instru-mento	Immunotrol	Lote react.	Operario	%CD8+	%CD4	CD3+ células/µl	CD4+ células/µl	CD8+ células/µl
Citómetro de flujo DxFLEX	Lote 1	Lote 1	OP1	1,250 %	4,428 %	5,896 %	5,381 %	8,893 %
	Lote 1	Lote 2	OP1	2,248 %	4,672 %	5,924 %	6,352 %	6,954 %
	Lote 1	Lote 3	OP1	1,756 %	4,301 %	4,398 %	4,298 %	6,815 %
	Lote 1	Lote 1	OP2	1,557 %	4,199 %	3,341 %	3,661 %	5,319 %
	Lote 1	Lote 2	OP2	1,750 %	5,273 %	3,704 %	3,545 %	7,943 %
	Lote 1	Lote 3	OP2	2,110 %	6,110 %	1,673 %	2,023 %	6,665 %
	Lote 1	Lote 1	OP3	1,669 %	5,929 %	4,378 %	5,213 %	6,531 %
	Lote 1	Lote 2	OP3	1,567 %	4,984 %	4,368 %	4,767 %	7,046 %
	Lote 1	Lote 3	OP3	1,794 %	5,010 %	2,827 %	4,141 %	3,958 %
	Lote 2	Lote 1	OP1	2,107 %	4,010 %	6,198 %	5,413 %	9,106 %
	Lote 2	Lote 2	OP1	1,276 %	3,683 %	4,897 %	5,259 %	5,914 %
	Lote 2	Lote 3	OP1	2,475 %	4,292 %	4,805 %	6,509 %	3,365 %
	Lote 2	Lote 1	OP2	2,043 %	5,186 %	5,813 %	6,788 %	6,044 %
	Lote 2	Lote 2	OP2	1,685 %	4,427 %	3,070 %	3,644 %	5,948 %
	Lote 2	Lote 3	OP2	1,936 %	5,258 %	4,386 %	3,514 %	8,021 %
	Lote 2	Lote 1	OP3	1,486 %	3,020 %	2,592 %	2,751 %	4,372 %
	Lote 2	Lote 2	OP3	1,779 %	3,815 %	4,536 %	4,952 %	4,803 %
	Lote 2	Lote 3	OP3	1,248 %	4,616 %	4,559 %	3,624 %	8,542 %
Citómetro de flujo BD FACSCalibur™	Lote 1	Lote 1	OP1	2,337 %	5,071 %	5,951 %	5,609 %	8,012 %
	Lote 1	Lote 2	OP1	2,031 %	3,939 %	6,378 %	7,050 %	7,758 %
	Lote 1	Lote 3	OP1	1,863 %	5,064 %	3,467 %	3,204 %	6,690 %
	Lote 1	Lote 1	OP2	1,973 %	3,908 %	5,860 %	5,021 %	8,197 %
	Lote 1	Lote 2	OP2	2,123 %	2,192 %	5,070 %	5,245 %	6,157 %
	Lote 1	Lote 3	OP2	2,901 %	5,435 %	4,341 %	5,594 %	6,284 %
	Lote 1	Lote 1	OP3	2,904 %	5,082 %	4,752 %	5,737 %	7,243 %
	Lote 1	Lote 2	OP3	1,986 %	3,167 %	3,329 %	3,293 %	5,316 %
	Lote 1	Lote 3	OP3	2,533 %	4,249 %	4,321 %	6,229 %	3,941 %
	Lote 2	Lote 1	OP1	1,760 %	4,942 %	5,105 %	4,701 %	7,760 %
	Lote 2	Lote 2	OP1	1,657 %	6,391 %	3,553 %	4,253 %	5,486 %
	Lote 2	Lote 3	OP1	1,335 %	4,509 %	4,882 %	5,498 %	5,654 %
	Lote 2	Lote 1	OP2	1,546 %	4,007 %	2,812 %	3,149 %	3,965 %
	Lote 2	Lote 2	OP2	1,98 %	6,196 %	6,511 %	7,170 %	8,156 %
	Lote 2	Lote 3	OP2	1,575 %	5,577 %	3,474 %	4,671 %	4,615 %
	Lote 2	Lote 1	OP3	2,014 %	6,053 %	4,306 %	4,772 %	7,124 %
	Lote 2	Lote 2	OP3	1,912 %	3,287 %	2,735 %	3,646 %	4,006 %
	Lote 2	Lote 3	OP3	1,735 %	3,376 %	2,774 %	3,383 %	3,815 %

Tabla 5. Reproducibilidad

Reproducibilidad en IMMUNO-TROL Low Control						
Población celular de linfocitos T		CD3+ células/µl	CD4+		CD3+ CD8+	
			Células/µL	%	Células/µL	%
Citómetro de flujo DxFLEX	Media	534,494	133,952	25,074 %	348,947	65,278 %
	SD	35,015	9,426	1,009 %	24,264	1,169 %
	CV	6,551 %	7,037 %	4,026 %	6,953 %	1,791 %
Citómetro de flujo BD FACSCalibur™	Media	508,522	100,451	20,339 %	342,632	69,298 %
	SD	39,130	9,395	1,405 %	28,825	1,749 %

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

Página 23 de 24

		CV	7,695 %	9,352 %	6,906 %	8,413 %	2,524 %

Reproducibilidad en IMMUNO-TROL Control

Población celular de linfocitos T		CD3+ células/µl	CD4+		CD3+ CD8+	
			Células/µL	%	Células/µL	%
Citómetro de flujo DxFLEX	Media	1025,781	653,746	63,73 %	319,028	31,10 %
	SD	53,274	35,117	0,93 %	18,943	0,85 %
	CV	5,19 %	5,37 %	1,47 %	5,94 %	2,75 %
Citómetro de flujo BD FACSCalibur™	Media	877,116	567,580	64,70 %	254,544	29,0 %
	SD	68,596	45,046	1,22 %	21,177	0,90 %
	CV	7,821 %	7,936 %	1,881 %	8,320 %	3,098 %

LIMITACIONES

1. El reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 solamente se ha validado para su uso con sangre completa tratada con K_2EDTA y K_3EDTA.
2. El reactivo DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8 es fotosensible. La exposición a la luz puede causar la degradación del reactivo, lo que podría conducir a resultados erróneos.
3. El usuario debe responsabilizarse de garantizar que el citómetro de flujo esté calibrado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
4. Es importante que los ajustes de voltaje se establezcan para ubicar las esferas de recuento fluorescente tal como se describe en las secciones Adquisición y análisis del citómetro de flujo para citómetros de flujo DxFLEX y Adquisición y análisis del citómetro de flujo para citómetros de flujo BD FACSCalibur™ y DxFLEX. Se debe comprobar visualmente la ventana de selección CD3+ para garantizar una selección de linfocitos T adecuada.
5. No se han observado interferencias a causa de factores exógenos como la presencia de fármacos comunes (paracetamol y biotina) y volúmenes de sangre inferiores a los recomendados, o a factores endógenos como niveles de colesterol elevados. Sin embargo, las sustancias interferentes pueden afectar al rendimiento del ensayo. Se observó que los factores endógenos como los niveles elevados de bilirrubina y triglicéridos causan una variabilidad de más de ± 870 % y del 17 % respectivamente en recuentos celulares absolutos de CD3+, CD4+ y CD8+ y de %CD4 y %CD8. En este ensayo no deben utilizarse muestras lipémicas ni esotéricas (que contienen sustancias o moléculas extrañas, como alérgenos y toxinas).
6. No se han analizado muestras de sangre hemolizadas o visiblemente coaguladas y no se deben utilizar en este ensayo.
7. Los intervalos de referencia proporcionados solo son para fines informativos. Cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

1. Si la población de linfocitos CD3+ no se muestra o no está clara en el trazado de puntos de fluorescencia CD3 PE-Dy649 frente a dispersión lateral:
   a. Configuración del instrumento:
      - Asegúrese de que el instrumento ha superado la comprobación de calificación, según la recomendación del fabricante.
      - Si va a utilizar BD FACSCalibur™, asegúrese de que se haya superado la configuración de BD FACSComp.
      - Si va a utilizar DxFLEX, asegúrese de que la matriz de compensación se haya introducido y sincronizado correctamente en Height Parameter (Parámetro de altura).
      - Asegúrese de que el valor de SSC PMT, en el caso de BD FACSCalibur™, o Gain (Ganancia), en el caso de DxFLEX, se haya ajustado correctamente para visualizar los linfocitos como se muestra en la Vista 1 y en la Vista 4 arriba.
   b. Calidad de la muestra
      - Asegúrese de que la antigüedad de la muestra sea inferior a 24 horas tras la punción venosa. (Consulte Obtención de muestras en la página 2).
      - Asegúrese de que la tinción de la muestra se lleve a cabo según lo descrito en el protocolo del ensayo.
      - Asegúrese de que la lisis de la muestra resulte en un lisado transparente. En caso contrario, prepare una muestra nueva.
   c. Reactivo
      - Asegúrese de que el reactivo no ha caducado y se ha almacenado correctamente.
2. Si la población de esferas no se muestra o no está clara en el trazado de puntos FL1 frente a FL2:
   a. Asegúrese de que el umbral en FL3 se ajuste de forma correcta para permitir la visualización de la población de esferas, tal como se representa en la Vista 1 y en la Vista 4.

REFERENCIAS

1. Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, & von dem BorneAEGKr, eds. Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Oxford university press 1989
2. Reinherz EL, Meuer SC, and Schlossman SF. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. Immunology Today, 1983, 4:5-8.
3. Fauci AS: The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science, 1988, 239:617-622.
4. Bernard, Alain, Laurence Boumsell, and Catherine Hill. Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories. Leucocyte Typing. New York, NY: Springer-Verlag 1984: 9-108.
5. Tunnacliffe, Alan, Carina Olsson, and Antonio de la Hera. The majority of human CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. International Immunology 1.5 (1989): 546-550.

DISPONIBILIDAD DEL PRODUCTO

Kit de reactivos DuraClone Tri T-STAT CD3/CD4/CD8
REF B39492

NOTA: * El citómetro de flujo DxFLEX está destinado solamente al diagnóstico in vitro en determinados países. Los clientes deben verificar el estado normativo antes del uso.

Para obtener información adicional o si el producto recibido presenta daños, llame al Servicio al cliente de Beckman Coulter en el 800-742-2345 (EE. UU. o Canadá) o póngase en contacto con su representante local de Beckman Coulter.

Puede consultar el glosario de símbolos en beckman.com/techdocs (Ref. C05838).

Beckman Coulter India Pvt. Ltd.
50-B, II Phase, Peenya Industrial Area
Peenya, Bangalore 560058, India

EC REP
IMMUNOTECH SAS
Una compañía de Beckman Coulter
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France

Printed in India

© 2018 Beckman Coulter, Inc.
Todos los derechos reservados.

Historial de revisiones

Revision 3.0, 07/2018

Se han realizado cambios en:

- Reescritura completa.

Dr. EDGARGDO J. GONZÁLEZ
APODERADO
BECKMAN COULTER ARG. S.A.

IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

Gabriela A. Cividino
Beckman Coulter Argentina S.A
FARMACÉUTICA
M.N. 15202/ M.P. 18093

República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2020 - Año del General Manuel Belgrano

Hoja Adicional de Firmas
Informe gráfico

Número: IF-2020-53102040-APN-DGA#ANMAT

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Miércoles 12 de Agosto de 2020

Referencia: ROTULOS Y INSTRUCCIONES

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 24 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2020.08.12 16:30:30 -03:00

susana topke
Auxiliar administrativo
Dirección General de Administración
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2020.08.12 16:30:31 -03:00