



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Disposición

Número:

Referencia: EX-2021-82634979-APN-DGA#ANMAT

VISTO el expediente N° EX-2021-82634979-APN-DGA#ANMAT del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma Becton Dickinson Argentina S.R.L. solicita autorización para la venta de los Productos médicos para diagnóstico *in vitro* denominados **340298 Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP, 340300 Tritest CD3/CD16+CD56/CD45, 340344 Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP, 340381 Tritest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP y 340383 Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP .**

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

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico que establece que el producto reúne las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

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

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

Por ello;

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

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) de los productos médicos para diagnóstico *in vitro* denominados: **340298 Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP**, **340300 Tritest CD3/CD16+CD56/CD45**, **340344 Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP**, **340381 Tritest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP** y **340383 Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP** de acuerdo con lo solicitado por la firma, Becton Dickinson Argentina S.R.L. con los Datos Identificatorios Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulos y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2022-65367171-APN-INPM#ANMAT.

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM 634-601”, con exclusión de toda otra leyenda no autorizada y/o contemplada en la normativa vigente.

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

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

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

NOMBRE COMERCIAL: 340298 Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP, 340300 Tritest CD3/CD16+CD56/CD45, 340344 Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP, 340381 Tritest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP y 340383 Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP.

INDICACION DE USO: BD Tritest: La familia de reactivos de diagnóstico *in vitro* BD Tritest™ son reactivos para inmunofluorescencia directa de tres colores para su uso con un citómetro de flujo debidamente equipado, para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos humanos T maduros (CD3+), de las siguientes subpoblaciones de linfocitos T, en sangre entera con los eritrocitos lisados: • Linfocitos T colaboradores (CD3+CD4+) • Linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3+CD8+) • Linfocito natural killer (NK) (CD3-CD16+CD56+) • Linfocitos B (CD19+) Todos estos reactivos cuando se usan con los tubos BD Trucount™ los recuentos absolutos de estas poblaciones se pueden obtener en un tubo individual. El reactivo BD Tritest y los tubos BD Trucount se pueden usar con el cargador BD FACS™ Loader. El reactivo se puede usar con o sin un control de isotipo. BD Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP BD Tritest™ CD4 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD8 marcado con ficoeritrina (PE)/CD3 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores. Se utiliza con tubos BD Trucount™ para identificar y obtener recuentos absolutos en células/μL de linfocitos humanos T (CD3+),

linfocitos T colaboradores (CD3+CD4+) y linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3+CD8+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. BD Tritest CD3/CD16+CD56/CD45 BD Tritest™ CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD16+CD56 marcados con ficoeritrina (PE)/CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores para usar con un citómetro de flujo debidamente equipado. Se usa para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos humanos T maduros (CD3+) y linfocitos natural killer (NK) (CD3–CD16+CD56+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. BD Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP BD Tritest™ CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD8 marcados con ficoeritrina (PE)/CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores para usar con un citómetro de flujo debidamente equipado. Se usa para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de los linfocitos humanos T maduros (CD3+) y de linfocitos T/ supresores/citotóxicos (CD3+CD8+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. BD Tritest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP BD Tritest™ CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD19 marcado con ficoeritrina (PE)/CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores para usar con un citómetro de flujo debidamente equipado. Se usa para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de las de linfocitos humanos T maduros (CD3+) y de linfocitos B (CD19+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. BD Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP BD Tritest™ CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD4 marcado con ficoeritrina (PE)/CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores para usar con un citómetro de flujo debidamente equipado. Se usa para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos humanos T maduros (CD3+) y de linfocitos T colaboradores (CD3+CD4+) en sangre entera con los eritrocitos lisados.

FORMA DE PRESENTACIÓN: BD Tritest™ contiene: 340298 Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP: 50 ensayos 340300 Tritest CD3/CD16+CD56/CD45: 50 ensayos y 50 ensayos con tubos BD Trucount™ 340344 Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP: 50 ensayos por frasco y 50 ensayos por frasco con tubos BD Trucount™ 340381 Tritest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP: 50 ensayos y 50 ensayos con tubos BD Trucount™ 340383 Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP: 50 ensayos y 50 ensayos con tubos BD Trucount™.

PERÍODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE PRESENTACIÓN: 340298 Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP: 24 meses 340300 Tritest CD3/CD16+CD56/CD45: 23 meses 340344 Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP:13 meses 340381 Tritest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP:16 meses 340383 Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP: 15 meses Almacenamiento: 2°C - 8 °C. No congelar ni exponer a la luz directa.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: para los códigos 340298 340300 340344 340381 340383: 1-Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences 2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131. 2-Becton Dickinson Caribe, LTD Vicks Drive, Lot 1 Corner Road 735 Cayey, PR Estados Unidos 00736. **CONDICIÓN DE VENTA/CATEGORÍA:** Venta exclusiva a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.

Nº EX-2021-82634979-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by GARAY Valéria Teresa
Date: 2022.10.15 23:09:57 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.10.15 23:10:01 -03:00

PROYECTO DE INSTRUCCIONES DE USO
340298 Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP

001 - 340298 IU ESP - 1



BD Tritest™
CD4/CD8/CD3

Para obtener recuentos absolutos de linfocitos T colaboradores,
supresores/citotóxicos y totales en sangre entera con eritrocitos lisados
50 ensayos— Número de catálogo 340298

03/2017

23-3525- 05

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

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

Becton, Dickinson and Company

BD Biosciences

2350 Qume Drive

San Jose, CA EE.UU. 95131 EE.UU.

Distribuidores en Australia y Nueva Zelandia:

Becton Dickinson Pty Ltd.

4 Research Park Drive

Macquarie University Research Park

North Ryde NSW 2113 , Australia

Becton Dickinson Limited

14b George Bourke Drive

Mt Wellington

340300 Tritest CD3/CD16+CD56/CD45

002 - 340300 IU ESP - 1



BD Tritest™ CD3/CD16+CD56/CD45

Para obtener los porcentajes y los recuentos absolutos de linfocitos humanos T y los linfocitos natural killer (NK) en sangre entera con los eritrocitos lisados.

Ensayos	N.º de catálogo
50 ensayos	340300
50 ensayos con tubos BD Trucount	340403

2/2018

23-3531-05

DISPOSITIVOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO (IVD)		Solo con receta
---	--	--------------------------------

© 2018 BD. La marca BD, el logotipo BD y todas las otras marcas registradas pertenecen a Becton, Dickinson and Company.

Becton, Dickinson and Company

BD Biosciences

2350 Qume Drive

San Jose, CA EE.UU. 95131 EE.UU.

Distribuidores en Australia y Nueva Zelanda

Becton Dickinson Pty Ltd.

4 Research Park Drive

340344 Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP

004 - 340344 IU ESP - - 1



BD Tritest CD3 FITC/ CD8 PE/CD45 PerCP

Reactivo

50 ensayos por frasco **Número de catálogo**
340344

50 pruebas por frasco **Número de catálogo**
con tubos BD **340406**
Trucount

Para obtener los porcentajes y los recuentos absolutos de linfocitos humanos T totales y linfocitos T supresores/citotóxicos en sangre entera con los eritrocitos lisados.

8/2010

23-3519-
04

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



Becton, Dickinson and Company

BD Biosciences

San Jose, CA EE.UU. 95131

Teléfono 877.232.8995

Fax 408.954.2347

ClinicalApplications@bd.com



BENEX Limited

Rineanna House

Shannon Free Zone

Shannon, Condado de Clare

Irlanda

340381 Tritest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP

003 – 340381 IU ESP



BD Tritest™ CD3/CD19/ CD45

Para obtener los porcentajes y los recuentos absolutos de linfocitos humanos T
totales y linfocitos B en sangre entera con los eritrocitos lisados.

Pruebas	N.º de catálogo
	364902
50 ensayos	340381
50 ensayos con tubos BD Trucount	340405

2/2018

23-3025-06

DISPOSITIVOS
PARA
DIAGNÓSTICO
IN VITRO
(IVD)

Solo con
receta

© 2018 BD. La marca BD, el logotipo de BD y todas las otras marcas registradas pertenecen a Becton, Dickinson and Company.

- Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA EE.UU. 95131 EE.UU.
Distribuidores en Australia y Nueva Zelanda:
Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde NSW 2113, Australia

340383 BD Tritest™ CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP

340383 IU SPA - 1



BD Tritest™ CD3/CD4/CD45

Para obtener los porcentajes y los recuentos absolutos de linfocitos humanos totales T y linfocitos T colaboradores en sangre entera con los eritrocitos lisados.

Ensayos	N.º de catálogo
50 ensayos	340383
50 ensayos con tubos BD Trucount	340402

11/2016

23-3027-08

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

© 2016 BD. La marca BD, el logotipo de BD y todas las otras marcas registradas pertenecen a Becton, Dickinson and Company.

Becton, Dickinson and Company

BD Biosciences

2350 Qume Drive,
San Jose, CA EE.UU. 95131 EE.UU.

Becton Dickinson Pty Ltd,

4 Research Park Drive,
Macquarie University Research Park,
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,

Establecimiento importador:

Becton Dickinson Argentina SRL

Depósito: Av Otto Krausse N° 4.205/ Av. Ingeniero Eiffel N° 4.180, sector J/4250, El

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



Triángulo, Partido de Malvinas Argentinas, Prov Buenos Aires, Argentina.

Teléfono: 0800-444-5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Establecimiento elaborador:

Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences

2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131
y/o

Becton Dickinson Caribe, L TD

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

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

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

Autorizado por la ANMAT. PM-634-601



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



BD Tritest™
CD4/CD8/CD3

Para obtener recuentos absolutos de linfocitos T colaboradores, supresores/citotóxicos y totales en sangre entera con eritrocitos lisados
50 ensayos— Número de catálogo 340298

03/2017

23-3525- 05

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

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

Becton, Dickinson and Company

BD Biosciences

2350 Qume Drive

San Jose, CA EE.UU. 95131 EE.UU.

Distribuidores en Australia y Nueva Zelanda:

Becton Dickinson Pty Ltd.

4 Research Park Drive

Macquarie University Research Park

North Ryde NSW 2113 , Australia

Becton Dickinson Limited

14b George Bourke Drive

Mt Wellington


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

Auckland 1060

Nueva Zelanda

bdbiosciences.com

ClinicalApplications@bd.com

1. USO PREVISTO

BD Tritest™ CD4 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD8 marcado con ficoeritrina (PE)/CD3 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores. Se utiliza con tubos BD Trucount™ para identificar y obtener recuentos absolutos en células/μL de linfocitos humanos T (CD3+), linfocitos T colaboradores (CD3+CD4+) y linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3+CD8+) en sangre entera con los eritrocitos lisados.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los linfocitos humanos se pueden dividir en tres poblaciones importantes de acuerdo con su función biológica y la expresión del antígeno en la superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y natural killer o NK.

Aplicaciones clínicas

Los linfocitos T colaboradores son una subpoblación de los linfocitos T (CD3+) que son CD4+. Los recuentos de CD3+CD4+ se utilizan para caracterizar y monitorear algunas formas de inmunodeficiencia¹⁻³ y enfermedades autoinmunes.^{4,5} Obtener los recuentos de linfocitos T colaboradores puede ser útil en el monitoreo de individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).⁶

Las personas con VIH en general presentan una disminución continua en los recuentos de linfocitos T colaboradores a medida que avanza la infección.

Los linfocitos supresores/citotóxicos son una subpoblación de los linfocitos T (CD3+) que son CD8+. Los recuentos de CD3+CD8+ se utilizan para caracterizar y controlar algunas formas de inmunodeficiencia y enfermedades autoinmunes. Los valores de los

linfocitos supresores/citotóxicos se encuentran fuera del rango normal en algunas enfermedades autoinmunes,⁸ y en determinadas reacciones inmunes como la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD, por su sigla en inglés)⁹ y en el rechazo de trasplantes.¹⁰ La población CD8+ es elevada en muchos pacientes con deficiencias congénitas o deficiencias inmunes adquiridas, como la inmunodeficiencia combinada severa (SCID, por su sigla en inglés) o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).⁶

A menudo, la población de células CD8+ es menor en pacientes con lupus sistémico eritematoso (LSE), si bien puede aumentar en pacientes con LSE sometidos a terapia con esteroides.¹¹

Los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) recomiendan el uso de combinaciones de reactivos con anticuerpos anti-CD3 para obtener el porcentaje de poblaciones de linfocitos T en individuos infectados con VIH.¹² El reactivo BD Tritest CD4/CD8/CD3 permite identificar los linfocitos T colaboradores y realizar el recuento sin interferencia de los monocitos CD3-CD4+ contaminados^{13 -15} y de los linfocitos NK CD3-CD8+.

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se agrega sangre entera al reactivo, los anticuerpos conjugados con el fluorocromo en el reactivo se unen específicamente a los antígenos de superficie del leucocito. Durante la adquisición, las células son impactadas por el haz de láser y la luz del láser se dispersa. Las células tincionadas producen fluorescencia. La dispersión y las señales de fluorescencia, que detecta el instrumento, brindan información sobre el tamaño de la célula, la complejidad interna y la intensidad relativa de la fluorescencia. Los reactivos BD Tritest emplean la estimulación por fluorescencia, lo que permite el gating (separación) por fluorescencia directa de la población de linfocitos^{13 -15} para reducir la contaminación con glóbulos rojos no lisados o nucleados en el gating.

Se tinciona un volumen conocido de muestra directamente en un tubo BD Trucount. El pellet liofilizado del tubo se disuelve y se libera una cantidad determinada de microesferas fluorescentes. Durante el análisis, se puede obtener la cantidad absoluta (células/ μ L) de células

positivas en la muestra comparando los eventos con células con los eventos con microesferas. Si se utiliza el software adecuado como BD Multiset™, los recuentos absolutos se obtendrán con el software. Si los datos se analizan manualmente con software como BD CellQuest™ Pro, dividir simplemente la cantidad de eventos celulares positivos por la cantidad de eventos con microesferas y luego multiplicar por la concentración de microesferas en los tubos BD Trucount.

4. REACTIVO

Reactivo suministrado, suficiente para realizar 50 ensayos. BD Tritest CD4/CD8/CD3 se entrega en 1 mL de solución salina tamponada con ázida sódica (0,1%). Contiene CD4 marcado con FITC, clon SK3;¹⁶⁻¹⁸ CD8 marcado con PE, clon SK1;^{16,17} y CD3 marcado con PerCP, clon SK7.¹⁹⁻²¹

CD4 identifica a los linfocitos T colaboradores y reconoce al antígeno anti-CD4, con un peso molecular de 59 kDa,²² que interactúa con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II y es el receptor primario para el VIH.^{23,24} La porción citoplasmática del antígeno se asocia con la proteína tirosina quinasa p56lck.²⁵

CD8 identifica a los linfocitos T supresores/citotóxicos y reconoce a un antígeno expresado como una subunidad 32-kDa de un complejo bimolecular con un puente de disulfuro.²⁶ El dominio citoplasmático de la subunidad α del antígeno anti-CD8 está asociado con la proteína tirosina quinasa p56lck.²⁵⁴ La molécula de CD8 interactúa con las moléculas MHC clase I, lo que aumenta la adhesión entre los linfocitos T CD8+ y las células diana.²⁷⁻²⁹⁵ La unión de la molécula de CD8 a las moléculas MHC clase I refuerza la activación de linfocitos T inactivados.²⁷⁻²⁹

CD 3 identifica los linfocitos T y reconoce la cadena épsilon del complejo (TCR) del antígeno anti-CD3/receptor del antígeno de las células T.³⁰ Este complejo está compuesto por al menos 6 proteínas cuyo peso molecular oscila entre 20 y 30 kilodaltones (kDa).³¹ El antígeno reconocido con los anticuerpos anti-CD3 se asocia de manera no covalente con un TCR α/β o γ/δ (70 a 90 kDa).³²

Los anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD3 están compuestos de cadenas pesadas murinas $\gamma 1$ y cadenas livianas kappa.

Los tubos BD Trucount contienen un pellet congelado en seco de microesferas fluorescentes en un tubo de uso único. Cada bolsa BD Trucount contiene 25 tubos, suficientes para 25 ensayos.

Precauciones

- Para uso en diagnósticos in vitro.
- No use el reactivo si observa algún cambio en el aspecto. La precipitación o la descoloración son indicio de inestabilidad o deterioro.

El reactivo del anticuerpo contiene ázida sódica como conservante. Sin embargo, tenga cuidado de evitar la contaminación microbiana que puede arrojar resultados erróneos.

ADVERTENCIA Todas las muestras y los materiales biológicos con los que entra en contacto se consideran peligros biológicos. Manipular como si existiera la posibilidad de transmisión de infecciones^{33,34} y eliminar con las precauciones adecuadas de acuerdo con las normas federales, estatales y locales. Nunca cargar la pipeta con la boca. Use indumentaria, gafas y guantes de protección adecuados. Se informó que la fijación desactiva el VIH.³⁵

- Se debe usar la solución lisante BD FACS™ que contiene dietilenglicol y formaldehído. Consulte las instrucciones de uso (IU) de la solución lisante BD FACS para conocer las advertencias.
- Es fundamental agregar un volumen preciso de sangre para alcanzar el resultado. Las pipetas se deben calibrar para administrar exactamente 50 μ L de muestra. Se puede conseguir una pipeta electrónica que funciona en modo de pipeteo inverso a través de BD (consultar la Sección 7, Procedimientos, sobre Reactivos y procedimientos requeridos pero que no se suministran). Si no se utiliza la pipeta indicada o una similar, utilice la técnica de pipeteo inverso (consultar Pipeteo inverso en la Sección 7, procedimientos para ver una breve descripción).

Consultar las instrucciones del fabricante de la pipeta para obtener más información.

- El recuento de microesferas varía por lote de los tubos BD Trucount. Es muy importante usar el recuento de microesferas del lote de los tubos BD Trucount que está en uso cuando se ingresa este valor en el software, o cuando se calcula un recuento absoluto de forma manual. No mezclar lotes de distintos tubos en el mismo ensayo.
- Los tubos BD Trucount están diseñados para usar con un procedimiento específico de lisado/no lavado. No intente fijar un umbral en la dispersión frontal (FSC) para la recopilación de datos.

Conservación y manipulación

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

Los valores de concentración se enumeran en la siguiente tabla:

Concentración del	reactivo (µg/mL)
CD4 FITC	1,0
CD8 PE	1,5
CD3 PerCP	6,25

5. INSTRUMENTO

El reactivo BD Tritest CD4/CD8/CD3 y los tubos BD Trucount están diseñados para usar en un citómetro de flujo equipado con el hardware

y el software de computación adecuado. El citómetro de flujo debe estar equipado con un láser de 488 nm para poder detectar la dispersión de la luz (frontal y lateral) y la fluorescencia de tres colores con una emisión que se pueda detectar en tres rangos: 515–545 nm, 562–607 nm y >650 nm. El instrumento debe poder generar un umbral o discriminar con el canal de >650-nm. Con este producto, se debe utilizar el cargador BD FACS Loader.

Recomendamos usar microesferas BD Calibrite™ y el software BD FACSCComp™, versión 2.0 o posterior, para ajustar el voltaje del tubo fotomultiplicador (PMT) y la compensación de la fluorescencia y controlar la sensibilidad del instrumento antes de usarlo. Los usuarios de citómetros de flujo fabricados por otras empresas que no sean BD deben consultar las instrucciones del fabricante para calibrar la inmunotipificación con tres colores.

BD también desarrolló aplicaciones como el software BD Multiset que calcula automáticamente los recuentos absolutos con los tubos BD Trucount. Sin embargo, se pueden utilizar otros paquetes de software para la adquisición y el análisis de datos y los recuentos absolutos se pueden calcular manualmente.

6. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recolectar la sangre en condiciones de asepsia por venopunción^{36,37} en un tubo estéril para recolección de sangre BD Vacutainer® EDTA. El reactivo BD Tritest CD4/CD8/CD3 se validó con fórmulas líquidas y deshidratadas de EDTA. Para este procedimiento se necesitan 100 µL de sangre entera. Seguir las pautas del fabricante del tubo de recolección en relación con el volumen mínimo de sangre a recolectar, para garantizar el uso adecuado.

Obtener un recuento de glóbulos blancos y un recuento diferencial de glóbulos blancos con la misma muestra de sangre entera antes de la tinción para garantizar que el recuento de glóbulos blancos esté dentro del rango lineal (consultar las Características de desempeño en la Sección 11).

La sangre anticoagulada conservada a temperatura ambiente (20°C–25°C) se debe tincionar dentro de las 48 horas de la extracción; se debe analizar dentro de las 6 horas posteriores a la tinción. Si las muestras se tincionan dentro de las 24 horas de la extracción, se pueden analizar dentro de las 24 horas de la tinción.

Condiciones de interferencia

No usar muestras del paciente previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre entera refrigeradas antes de la tinción pueden arrojar resultados anormales. Las muestras obtenidas de pacientes que toman inmunosupresores pueden alcanzar una resolución de baja calidad³⁸ Los blastocitos pueden interferir con los resultados de las ensayos. Se deben rechazar las muestras hemolizadas. No se validó el uso de BD Tritest CD4/CD8/CD3 con los anticoagulantes de heparina líquida o solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD) para realizar los recuentos absolutos con los tubos BD Trucount.

7. PROCEDIMIENTO

Reactivo suministrado

BD Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3

Reactivos y materiales requeridos pero que no se suministran con el equipo.

- Tubos BD Trucount para recuentos absolutos (Número de catálogo 340334). (Para ordenar BD Tritest CD4/CD8/CD3 con tubos BD Trucount, usar el número de catálogo 340401)
- 3 microesferas de calibración BD Calibrite (Número de catálogo 340486)
- Solución lisante BD FACS (10X), 100 mL (Número de catálogo 349202). Consultar las IU de la solución lisante BD FACS para conocer las instrucciones de dilución y las advertencias.
- Agua de grado reactivo (destilada o desmineralizada)
- Tubos para recolección de sangre BD Vacutainer EDTA o equivalentes
- Agitador vorticial
- Micropipeteador con puntas

- Dispensador a granel o pipeta (450 µL) para administrar solución lisante BD FACS
- Solución envolvente BD FACSThrow™ (Número de catálogo 342003) o equivalente

CUIDADO Solo use el diluyente para solución envolvente BD FACSThrow para diluir las microesferas BD Calibrite.

- Controles BD Trucount™ (Número de catálogo 340335)
- Control del proceso de lisado de la sangre entera (disponible para la comercialización)

Tinción de las células

Lisar los eritrocitos que siguen a la tinción con la solución lisante BD FACS. Proteger los tubos de la luz directa. Realizar el procedimiento a temperatura ambiente (20°C– 25°C). Consultar las Precauciones en la Sección 4, Reactivo y condiciones de interferencia en la Sección 6, Recolección y preparación de las muestras

Pipeteo inverso

Es fundamental agregar un volumen preciso de sangre para alcanzar el resultado. Si no se utiliza una pipeta electrónica de BD o similar a que suministra un volumen preciso de sangre, aplique la técnica de pipeteo inverso. Esta técnica aprovecha los dos toques de la pipeta.

1. Para el pipeteo inverso, presione el botón hasta el segundo tope. Cuando suelta el botón, el exceso de muestra es absorbido por la punta.
2. Presione el botón hasta el primer tope. Descargue el volumen exacto de muestra; el exceso queda en la punta.

Tinción

1. Para cada paciente, rotular un tubo BD Trucount con el número de identificación de la muestra.

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

2. Cargar con la pipeta 20 μ L de reactivo BD Tritest CD4/CD8/CD3 en el fondo del tubo BD Trucount. Descargue la pipeta por encima del retenedor de acero inoxidable. No tocar el pellet.
3. Colocar con la pipeta 50 μ L de sangre entera anticoagulada bien mezclada en el fondo del tubo.

NOTA Evite manchar con sangre la pared del tubo. Si la sangre entera permanece en la pared del tubo, el reactivo no se tincionará. Es fundamental que el procedimiento sea exacto. Usar la técnica de pipeteo inverso (Consultar la sección sobre Pipeteo inverso) para descargar la muestra por la pared por encima del retenedor.

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

Citometría de flujo

- Si las muestras no se analizan de inmediato luego de la tinción, consérvelas lejos de la luz a temperatura ambiente (20°C–25°C).
- Agitar bien las células a baja velocidad para reducir la aglutinación antes de correr las muestras en el citómetro de flujo.³⁹
- Si usa el cargador BD FACS Loader, agite los tubos inmediatamente antes de colocarlos en las gradillas del cargador.
- Obtener y analizar los datos en modo lista con la aplicación adecuada como el software BD CellQuest Pro o BD Multiset.
- Antes de la adquisición de las muestras, ajustar el umbral para reducir al mínimo los restos celulares y garantizar que queden incluidas las poblaciones de interés.

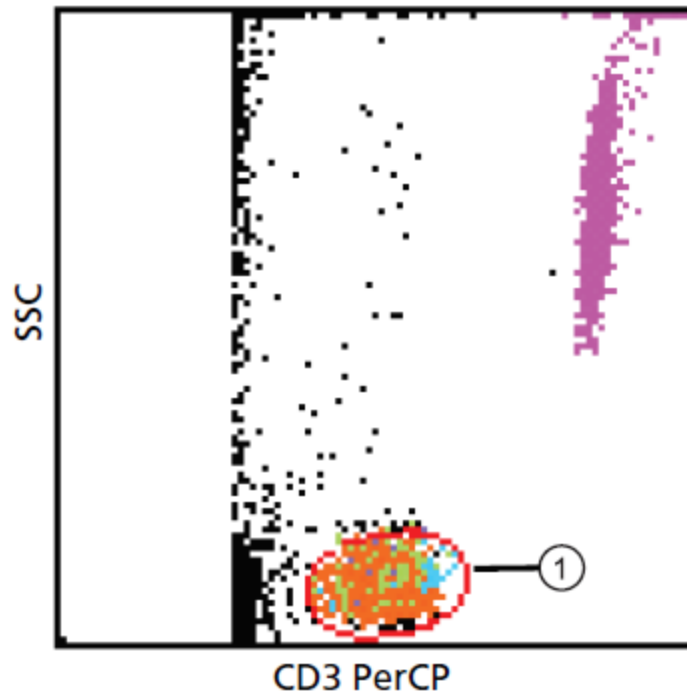
Control de calidad

- Correr una muestra de control todos los días de un individuo adulto normal o un control de sangre entera comercial para optimizar los ajustes del instrumento y como control de la calidad del sistema.³⁷

- Use controles comerciales con valores establecidos para porcentajes positivos y recuentos absolutos en cada corrida para evaluar el desempeño del sistema.
- Inspeccione visualmente CD3 en el gráfico de puntos SSC. La población de linfocitos T debe aparecer como un grupo CD3+ compacto con SSC bajo. No siga con el análisis si las poblaciones de linfocitos T son difusas o si la separación entre grupos es poca o inexistente.

Consultar la Figura 1, la Figura 2 y la Figura 3 para ver datos representativos de un individuo hematológicamente normal tincionada con CD4/CD8/CD3 en un tubo BD Trucount.

Figure 1 CD3 sin separar en el gráfico de puntos SSC(1) = linfocitos CD3+



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

Figure 2 CD4 sin separar en el gráfico de puntos CD8 con tubos BD Trucount con microesferas separadas (1 = microesferas de recuento absoluto)

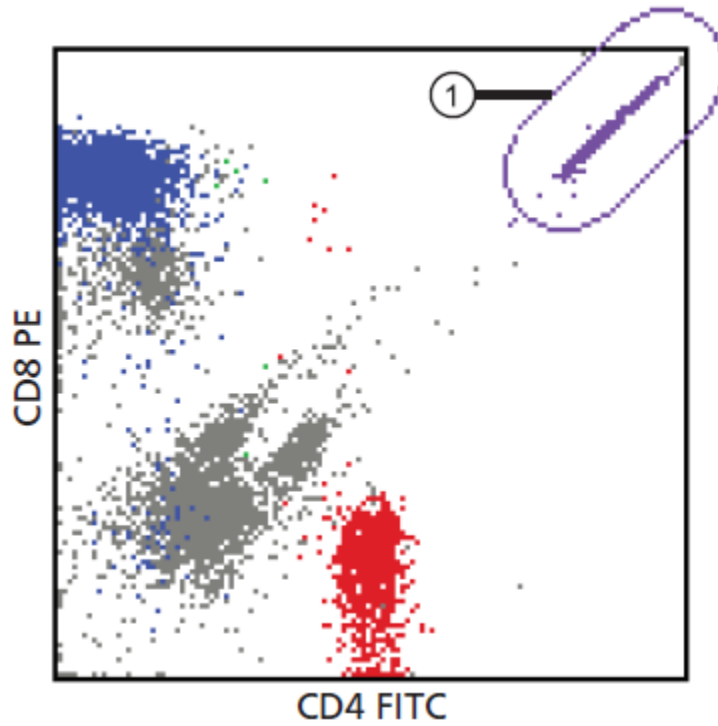
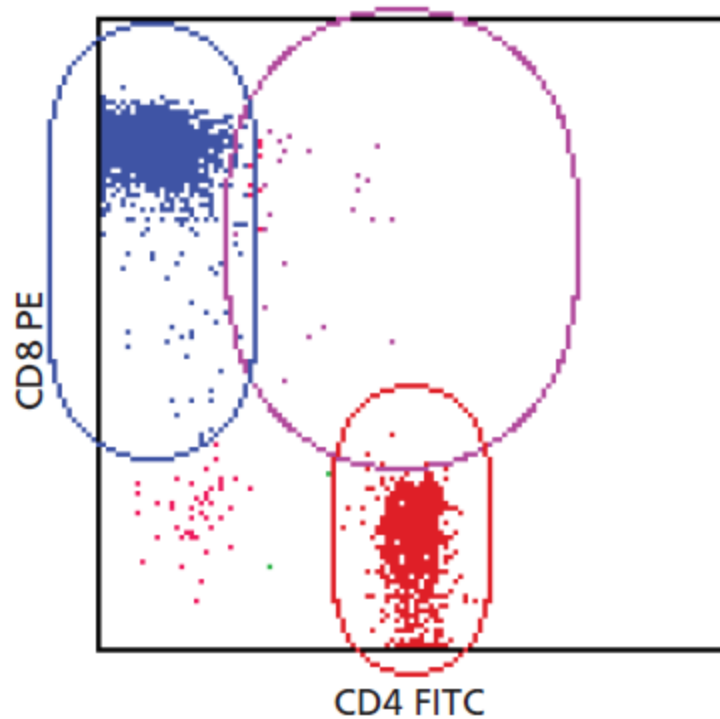


Figure 3 Linfocitos T CD4 sin separarse en el gráfico de puntos CD8



8. RESULTADOS

Los resultados se informan como la cantidad de células positivas por microlitro de sangre (recuento absoluto).

Cálculo de los recuentos absolutos

Durante el análisis, se puede determinar la cantidad absoluta (células/ μ L) de células positivas en la muestra comparando los eventos con células con los eventos con microesferas. Si se utiliza el software BD Multiset, los recuentos absolutos se obtendrán con el software.

Para realizar el análisis manual de los datos con el software BD CellQuest Pro o con otro software, solo divide la cantidad de eventos celulares positivos por la cantidad de eventos con microesferas. Luego multiplique la concentración de microesferas BD Trucount con la siguiente ecuación:

$$A = B/C \times D/E$$

donde:

A = recuento absoluto de población celular

B = cantidad de eventos en el áreas con células

C = cantidad de eventos en el área de la microesferas en los recuentos absolutos

D = cantidad de microesferas por ensayo*

E = volumen del ensayo

* Este valor se encuentra en el rótulo del envase de los tubos BD Trucount y puede variar entre lotes.

9. LIMITACIONES

- Los laboratorios deben establecer sus propios rangos normales de referencia para los parámetros de los reactivos BD Tritest CD4/CD8/CD3 que pueden ser afectados por el sexo y la edad del paciente y la técnica de preparación. El origen racial del paciente⁴⁰ y las variaciones individuales en la expresión del epitopo⁴¹ también pueden tener incidencia, si bien no existen suficientes datos para determinarla. Se deben conocer la edad, el sexo, las características clínicas y el origen racial de los pacientes cuando se establece un intervalo de referencia.⁴² Los intervalos de referencia se suministran solo con fines informativos.

- No se validó el uso del reactivo BD Tritest CD4/CD8/CD3 con los anticoagulantes de heparina líquida o solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD) para realizar los recuentos absolutos con los tubos BD Trucount.
- El reactivo BD Tritest CD4/CD8/CD3 no ha sido diseñado para evaluar muestras para la detección de células leucémicas para uso en la fenotipificación de muestras de pacientes con leucemia.
- Los recuentos absolutos no se pueden comparar entre laboratorios que usan equipos de fabricantes distintos.

10. VALORES PREVISTOS

Rangos de referencia

Los rangos de referencia para los linfocitos T CD4+, CD8+, and CD3+ de la Tabla 1 se establecieron internamente en BD Biosciences en San Jose, California y en cuatro centros externos: Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH; Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD; Instituto de Medicina Tropical, Amberes, Bélgica; y la Universidad del Hospital de Carolina del Norte, Chapel Hill, Carolina del Norte. Las edades de los individuos hematológicamente normales oscilaron entre los 18 y los 65 años de edad.

Tabla 1 Rangos de referencia representativos en adultos hematológicamente normales

Población	n	Media	Percentil menor a 2,5	Percentil superior a 97,5
Linfocitos T colaboradores (células/ μ L) ^a	523	880	410	1590
Linfocitos T supresores/citotóxicos (células/ μ L) ^a	523	490	190	1140
Repetibilidad Linfocitos T (células/ μ L) ^a	516	1410	690	2540

a. Los valores absolutos se redondean a la concentración 10 células/ μ L más cercana.

Estos rangos de referencia están agrupados. Consultar la Sección 9 para obtener más información sobre los rangos de referencia.

11. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

Se estableció el desempeño de los reactivos mediante ensayos realizados en los laboratorios de BD Biosciences en San Jose, CA, en un centro clínico externo en los Estados Unidos de América o Europa o en una combinación de centros.

Exactitud

Los recuentos absolutos para los linfocitos CD3+CD4+ y CD3+CD8+ se compararon con los resultados obtenidos en el sistema BD FACSCount™.

Se analizaron alícuotas de la misma muestra de sangre de donantes con valores anormales y normales. El análisis de regresión de la Tabla 2 indica que los resultados son esencialmente equivalentes.

Tabla 2 Análisis de regresión

Subconjunto	n	Pendiente	Intersección	r	Rango
Linfocitos T colaboradores (células/ μ L)	201	1,02	4 células/ μ L	0,99	0–1.880 ^a
Linfocitos T supresores/citotóxicos (células/ μ L)	196	1,00	29 células/ μ L	0,99	70–1.980 ^a
Total Linfocitos T (células/ μ L)	199	1,02	8 células/ μ L	0,99	70–2.860 ^a

a. Valores absolutos redondeados a la concentración 10 células/ μ L más cercana.

Reproducibilidad dentro de la muestra

Se evaluaron tres alícuotas de muestras provenientes de tres muestras que representan recuentos de CD4 altos, medios y bajos. Los resultados se observan en la Tabla 3.

Tabla 3 Reproducibilidad dentro de la muestra para el reactivo BD Tritest CD4/CD8/CD3

Población	Nivel	Media	SD ^a	CV ^b (%)
Linfocitos T colaboradores (células/ μ L)	Alta	2.048	86	4,2
	Mediano	1.311	37	2,9
	Bajo	355	10	2,7
Linfocitos T supresores/ citotóxicos (células/ μ L)	Alta	729	25	3,5
	Mediano	483	19	3,9
	Bajo	334	12	3,7

Tabla 3 Reproducibilidad dentro de la muestra para el reactivo BD Tritest CD4/CD8/CD3

Subconjunto	Nivel	Media	SD ^a	CV ^b (%)
Linfocitos T totales (células/ μ L)	Alto	2.770	100	3,6
	Mediano	1.869	52	2,8
	Bajo	711	18	2,6

a. SD = desvío estándar

b. CV = coeficiente de variación

Estabilidad

Se realizó un estudio de estabilidad para evaluar el efecto del tiempo sobre las especificaciones de desempeño del reactivo BD Tritest. El estudio midió: 1) los cambios asociados con la conservación de la sangre entera antes de la tinción; 2) los cambios por el tiempo

transcurrido entre la tinción y la adquisición de datos, y e) la combinación de los dos.

Sobre la base de los resultados de este estudio, recomendamos tincionar las muestras dentro de las 48 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 6 horas de la tinción o tincionar las muestras dentro de las 24 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 24 horas de la tinción.

Reactividad cruzada

El anticuerpo anti-CD4 reacciona con los monocitos como así también con los linfocitos T colaboradores.¹⁸ El anticuerpo anti-CD8 reacciona con los linfocitos NK⁴³ y con los linfocitos T supresores/citotóxicos.

Linealidad

Se evaluó la linealidad en una concentración de glóbulos blancos de $2,5 \times 10^3$ hasta $31,0 \times 10^3$ glóbulos blancos/ μL y una concentración de linfocitos de $2,0 \times 10^2$ hasta $16,7 \times 10^3$ linfocitos/ μL . Se observó que los resultados fueron lineales en el rango CD3+CD4+ (68 a $7,2 \times 10^3$ células/ μL), el rango CD3+CD8+ (43 a $3,9 \times 10^3$ células/ μL) y el rango CD3+ (123 a $9,1 \times 10^3$ células/ μL).

GARANTÍA

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

SOLO SE GARANTIZA LA CANTIDAD Y EL CONTENIDO INDICADO EN EL RÓTULO DEL PRODUCTO AL MOMENTO DE LA ENTREGA AL CLIENTE. POR LA PRESENTE, BD DECLINA SU RESPONSABILIDAD POR TODAS LAS OTRAS GARANTÍAS, EXPRESAS O IMPLÍCITAS, QUE INCLUYEN LA GARANTÍA DE COMERCIALIZACIÓN O NO VIOLACIÓN O DE IDONEIDAD PARA UN USO DETERMINADO. LA RESPONSABILIDAD EXCLUSIVA DE BD SE LIMITA AL REEMPLAZO DE LOS PRODUCTOS O EL REEMBOLSO DEL PRECIO DE COMPRA. BD NO ES RESPONSABLE POR LOS DAÑOS A LA PROPIEDAD NI POR DAÑOS ESPECIALES O INDIRECTOS, INCLUIDAS LAS LESIONES PERSONALES O LAS PÉRDIDAS ECONÓMICAS CAUSADAS POR

EL PRODUCTO.

REFERENCIAS

1. Schmidt RE. Anticuerpos monoclonales para diagnóstico de inmunodeficiencias. *Blut*. 1989;59:200- 206.
2. Nicholson JKA. Uso de la citometría de flujo en la evaluación y el diagnóstico de enfermedades de inmunodeficiencia primaria y secundaria. *Arch Pathol Lab Med*. 1989;113:598- 605.
3. Foucar K, Goeken JA. Aplicación clínica de las técnicas inmunológicas en el diagnóstico de trastornos linfoproliferativos y de inmunodeficiencia. *Laboratorio Médico*. 1982;13:403- 413.
4. Cohen SB, Weetman AP. Linfocitos intersticiales e intraepiteliales activados en la enfermedad autoinmune de tiroides. *Acta Endocrinol*. 1988; 119:161-166.
5. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneidad de las poblaciones de células T inmunoregulatorias en el lupus eritematoso sistémico; correlación con las características clínicas. *Am J Med*. 1982; 72:783-790.
6. Giorgi JV, Hultin LE. Alteraciones en las poblaciones de linfocitos e inmunofenotipificación por citometría de flujo en la enfermedad por VIH. *Boletín de Inmunología Clínica*. 1990; 10:55-61.
7. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Aplicación de la citometría de flujo al estudio de la infección por VIH. *SIDA*. 1990; 4:479-497.
8. Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Función celular del supresor defectuoso mediada por líneas de células T8+ de pacientes con esclerosis múltiple progresiva. *J Immunol*. 1986; 137:3436-3439.
9. Gratama JW, Naipal A, Oljans P y otros. Repoblación de linfocitos T y diferenciación luego del trasplante de médula ósea: los primeros cambios en la proporción de linfocitos T4+ y T8+ T se correlaciona con la aparición de la enfermedad de injerto contra huésped. *Sangre*. 1984; 63:1416-1423.
10. Bishop GA, Hall BM, Duggin GG, Horvath JS, Sheil AGR, Tiller DJ. Inmunopatología del rechazo de injerto renal analizado con anticuerpos monoclonales en marcadores celulares mononucleares. *Kidney Internat*. 1986; 29:708-717.

11. Wolde-Mariam W, Peter JB. Avances diagnósticos recientes en la inmunología celular. Diagnóstico Médico. 1984; 07:25-32.
12. Centros para el Control de Enfermedades. 1997 Pautas revisadas para realizar determinaciones de las células CD4+ T en personas con virus de inmunodeficiencia humana (VIH). MMWR. 1997; 46:1-29.
13. Nicholson JKA, Jones BM, Hubbard M. Recuentos de linfocitos T con CD4 en muestras de sangre entera con un ensayo en un tubo individual con tres colores. Citometría. 1993; 14:685-689.
14. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Suplemento sobre los tres colores en las pautas NIAID DAIDS para inmunotipificación en la citometría de flujo. Citometría. 1996; 26:227-230.
15. Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Uso de la fluorescencia CD45 y de la dispersión lateral para separar linfocitos cuando se usa el procedimiento de lisado de la sangre entera y la citometría de flujo. Citometría. 1996; 26:16-21.
16. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD y otros. Antígenos de la membrana dependientes del timo en hombres; inhibición de linfólisis mediada por células mediante anticuerpos monoclonales para el antígeno TH2. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 1981; 78:544-548.
17. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Informe conjunto del primer taller internacional sobre los antígenos de diferenciación para leucocitos humanos realizado por investigadores de los laboratorios participantes: Protocolo para T2. Editores: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF. Tipificación de leucocitos. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:25-60.
18. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Los anticuerpos anti-Leu-3/T4 reaccionan con los monocitos/macrófagos y las células de Langerhans. J Immunol. 1983; 131:212-216.
19. Haynes BF. Resumen de los estudios con células T realizado durante el Segundo Taller y Conferencia Internacional sobre Antígenos de Diferenciación en Leucocitos Humanos. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.

20. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Las subunidades con unión no covalente de 22 y 28 kd son asimiladas rápidamente por las células T que reaccionan con el anticuerpo Anti-Leu-4. J Immunol. 1983; 131:536-539.
21. Knowles RW. Análisis inmunoquímico de los antígenos específicos para células T. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T. New York, NY: Springer-Verlag; 1986; 1:259-288.
22. Comité Organizador del Cuarto Taller Internacional sobre Antígenos de Diferenciación de los Leucocitos Humanos. Apéndice A: Guía CD. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press Inc; 1989:1074-1093.
23. Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. El antígeno anti-CD4 (T4) es un componente esencial del receptor para el retrovirus del SIDA. Nature. 1984; 312:763-767.
24. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. El gen T4 codifica el receptor del virus del SIDA y está expresado en el sistema inmune y en el cerebro. Células. 1986; 47:333-348.
25. Rudd CE, Burgess KE, Barber EK, Schlossman SF. Anticuerpos monoclonales para las cantidades variables de precipitado de antígenos anti-CD4 y anti-CD8 de la actividad de p56lck asociada con CD4/CD8. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:326-327.
26. Moebius U. Informe del clúster: CD8. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
27. Gallagher PF, Fazekas de St. Groth B, Miller JFAP. Las moléculas de CD4 y de CD8 se pueden asociar físicamente con el mismo receptor de las células T. Proc Natl Acad Sci, EE.UU. 1989; 86:10044-10048.
28. Anderson P, Blue M-L, Morimoto C, Schlossman SF. El

- entrecruzamiento de T3 (CD3) con T4 (CD4) favorece la proliferación de linfocitos T inactivados. *J Immunol.* 1987; 139:678-682.
29. Eichmann K, Jönsson J-I, Falk I, Emrich F. Activación efectiva de los linfocitos T murinos inactivados mediante el entrecruzamiento de concentraciones submitogénicas de los receptores del antígeno de las células T con Lyt-2 o L3T4. *Eur J Immunol.* 1987; 17:643-650.
 30. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM y otros. Expresión citoplasmática del antígeno anti-CD3 como marcador diagnóstico para neoplasias de células T inmaduras. *Sangre.* 1988; 71:603-612.
 31. Brenner MB, McClean J, Dialynas DP y otros. Identificación de un segundo receptor putativo de células T. *Nature.* 1986; 322:145-149.
 32. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. El complejo e células T receptoras/CD3: un ensamble proteico dinámico. *Annu Rev Immunol.* 1988; 6:629-662.
 33. Centros para el Control de Enfermedades. Actualización sobre las perspectivas en la prevención de enfermedades y promoción de la salud: precauciones universales para la prevención en la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis B y otros patógenos de la sangre en entornos sanitarios. *MMWR.* 1988; 37:377-388.
 34. Protección del personal de laboratorio de las infecciones adquiridas en el ámbito laboral; Pautas aprobadas — Tercera edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2005. Documento CLSI M29-A3.
 35. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivación de las células H9 infectadas con VIH en preparaciones de sangre entera con reactivos de lisis/fijación en la citometría de flujo. *J Immunol Methods.* 1993; 160:215-218.
 36. Procedimientos para la recolección de muestras de sangre con fines diagnósticos por venopunción: Estándar aprobado—Sexta edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2007. Documento CLSI GP41-A6.
 37. Enumeración de poblaciones de células definidas inmunológicamente mediante citometría de flujo; directrices

- aprobadas—Segunda edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2007. Documento CLSI H42-A2.
38. Giorgi JV. Mediciones del subgrupo de linfocitos: importancia en la medicina clínica. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL. Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:236- 246.
 39. Jackson AL, Warner NL. Preparación, tinción y análisis por citometría de flujo de leucocitos periféricos en la sangre.. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL., editores Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:226- 235.
 40. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influencia del origen racial en la distribución de las poblaciones de células T y de los linfocitos con Leu-11 positivo en donantes de sangre sanos. Inmunología diagnóstica. 1985; 03:33-37.
 41. Angadi CV. Ausencia de epítipo Leu-3a en los linfocitos colaboradores T (CD4). J Clin Lab Anal. 1990; 4:193-195.
 42. Definición, establecimiento y verificación de los intervalos de referencia en el laboratorio clínico —Tercera edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2010. Documento CLSI EP28 - A3c.
 43. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpoblaciones de células humanas natural killer definidas por la expresión de los antígenos Leu-7 (HNK-1) y Leu-11 (NK-15). J Immunol. 1983;131:1789-1796.


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



BD Tritest™
CD3/CD16+CD56/CD45

Para obtener los porcentajes y los recuentos absolutos de linfocitos humanos T y los linfocitos natural killer (NK) en sangre entera con los eritrocitos lisados.

Ensayos	N.º de catálogo
50 ensayos	340300
50 ensayos con tubos BD Trucount	340403

2/2018

23-3531-05

DISPOSITIVOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO (IVD)		Solo con receta
---	--	--------------------------------

© 2018 BD. La marca BD, el logotipo BD y todas las otras marcas registradas pertenecen a Becton, Dickinson and Company.

Becton, Dickinson and Company

BD Biosciences

2350 Qume Drive

San Jose, CA EE.UU. 95131 EE.UU.

Distribuidores en Australia y Nueva Zelanda

Becton Dickinson Pty Ltd.

4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited

14b George Bourke Drive
Mt Wellington
Auckland 1060
Nueva Zelanda

bdbiosciences.com

ClinicalApplications@bd.com

1. USO PREVISTO

BD Tritest™ CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD16+CD56 marcados con ficoeritrina (PE)/CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores para usar con un citómetro de flujo debidamente equipado. Se usa para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos humanos T maduros (CD3+) y linfocitos natural killer (NK) (CD3–CD16+CD56+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. Cuando se usa con los tubos BD Trucount™ los recuentos absolutos de estas poblaciones se pueden obtener en un tubo individual.

Los tubos BD Trucount se pueden usar con el cargador BD FACS™ Loader. El reactivo se puede usar con o sin un control de isotipo.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

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

Aplicaciones clínicas

Los linfocitos NK identificados como CD3– y CD16+ y/o CD56+ han demostrado ejercer una actividad citotóxica contra tumores y células

infectadas con VIRUS.¹ La citotoxicidad ejercida por los linfocitos NK no requiere la presencia de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por su sigla en inglés) clase I o clase II en la célula diana.²

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se agrega sangre entera al reactivo, los anticuerpos conjugados con el fluorocromo en el reactivo se unen específicamente a los antígenos de superficie del leucocito. Durante la adquisición, las células atraviesan el haz de láser y dispersan la luz del láser. Las células tincionadas tienen fluorescencia. La dispersión y las señales de fluorescencia, que detecta el instrumento, brindan información sobre el tamaño de la célula, la complejidad interna y la intensidad relativa de la fluorescencia. Los reactivos de BD Tritest emplean la estimulación por fluorescencia, lo que permite el gating (separación) por fluorescencia directa de la población de linfocitos,³⁻⁵ para reducir la contaminación con glóbulos rojos no lisados o nucleados en el gating.

Cuando se utilizan los tubos BD Trucount, se tinciona un volumen predeterminado de la muestra directamente en un tubo BD Trucount. El pellet liofilizado del tubo se disuelve y se libera una cantidad determinada de microesferas fluorescentes. Durante el análisis, la cantidad absoluta (células/ μ L) de células positivas en la muestra se pueden determinar comparando los eventos con células con los eventos con microesferas. Si se utiliza el software adecuado, como BD Multiset™, los recuentos absolutos se determinarán con el software. Si el análisis de datos se realiza en forma manual con software como BD CellQuest™ Pro, dividir simplemente la cantidad de eventos celulares positivos por la cantidad de eventos con microesferas y luego multiplicar por la concentración de microesferas en los tubos BD Trucount™.

4. REACTIVO

Reactivo suministrado, suficiente para 50 ensayos

El reactivo BD Tritest CD3/CD16+CD56/CD45 se suministra en 1 mL de solución salina tamponada con albúmina de suero bovino y ázida sódica

(0,1%). Contiene CD3 marcado con FITC, clon SK7;⁶⁻⁸ CD16 marcado con PE, clon B73.1.;⁹⁻¹¹ y CD56, clon NCAM 16.2¹², y CD45 marcado con PerCP, clon 2D1 (HLe-1).¹³

CD 3 identifica los linfocitos T y reconoce la cadena épsilon del complejo (TRC) del antígeno anti-CD3/receptor del antígeno de las células T.¹⁴ Este complejo está compuesto por al menos 6 proteínas cuyo peso molecular oscila entre 20 y 30 kilodaltones (kDa).¹⁵ El antígeno reconocido con los anticuerpos anti-CD3 se asocia de manera no covalente con el TCR α/β o γ/δ (70 a 90 kDa).¹⁶

CD16 y CD56 juntos facilitan la identificación de la población de linfocitos NK.^{1,4} CD16 reconoce el antígeno del linfocito NK humano de 50- a 70-kDa que es un receptor Fc para IgG.^{9,10,17} El antígeno CD16 reacciona de manera variable con los granulocitos.¹⁰ CD56 reconoce un dominio del tipo de la inmunoglobulina extracelular común en tres pesos moleculares (120, 140 y 180 kDa) de la molécula de adhesión celular neural (NCAM).¹⁸⁻²⁰

CD45 identifica leucocitos y reconoce el antígeno de los leucocitos humanos de 180- a 220-kDa que forma parte de la familia de antígenos comunes de leucocitos (LCA, por su sigla en inglés).²¹

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

Los tubos BD Trucount contienen un pellet congelado en seco de microesferas fluorescentes en un tubo de uso único. Cada bolsa BD Trucount contiene 25 tubos, suficientes para 25 ensayos.

Los valores de concentración se enumeran en la siguiente tabla:

Concentración del	reactivo ($\mu\text{g/mL}$)
CD3 FITC	2,0
CD16 PE	1,5
CD56 PE	1,0

CD45 Per CP

6,25

Precauciones

- Para uso en diagnósticos in vitro.
- No use el reactivo si observa algún cambio en el aspecto. La precipitación o la descoloración son indicio de inestabilidad o deterioro.
- El reactivo del anticuerpo contiene ázida sódica como conservante. Sin embargo, tenga cuidado de evitar la contaminación microbiana que puede arrojar resultados erróneos.

ADVERTENCIA Todas las muestras y los materiales biológicos con los que entra en contacto se consideran peligros biológicos. Manipular como si existiera la posibilidad de transmitir infecciones ^{22,23} y eliminar con las precauciones adecuadas de acuerdo con las normas federales, estatales y locales. Nunca cargar la pipeta con la boca. Use indumentaria, gafas y guantes de protección adecuados. Se informó que la fijación desactiva el VIH. ²⁴

- Se debe usar la solución lisante BD FACS™ que contiene dietilenglicol y formaldehído. Consultar las instrucciones de uso (IU) de la *solución lisante BD FACS* para conocer las advertencias.
- Si se utiliza BD Trucount, es fundamental agregar un volumen preciso de sangre para alcanzar el resultado. Las pipetas se deben calibrar para administrar exactamente 50 µL de muestra. Se puede conseguir una pipeta electrónica que funciona en modo de pipeteo inverso a través de BD. Si no se utiliza esta pipeta o una similar, utilice la técnica de pipeteo inverso (consultar Pipeteo inverso en la Sección 7 para ver una breve descripción). Consultar las instrucciones del fabricante de la pipeta para más información.
- El conteo de microesferas varía por lote de BD Trucount. Es muy importante usar el recuento de microesferas del lote en uso de los BD Trucount cuando se ingresa este valor en el software, o cuando se obtiene un recuento absoluto de forma manual. No mezclar lotes de distintos tubos en el mismo ensayo.
- Los BD Trucount están diseñados para usar con un procedimiento específico de lisado/no lavado. No intente fijar un

umbral en dispersión frontal (FSC) para la recopilación de datos.

Conservación y manipulación

- Conservar el reactivo a una temperatura de 2°C–8°C. No use luego de la fecha de caducidad del rótulo.
- No congele el reactivo ni lo exponga a la luz directa durante la conservación o la incubación con células. Mantenga el frasco con el reactivo seco.
- Conservar los tubos BD Trucount en el envase original a una temperatura de 2°C–25°C. Para evitar la condensación potencial, abrir la bolsa solo luego de que se alcanzó la temperatura ambiente y volver a sellarla con cuidado luego de retirar el tubo. Examine el disecante cada vez que se abre la bolsa. Si el color del disecante cambió de azul a lavanda, descartar los tubos restantes. Usar los tubos dentro de la hora luego de retirar la bolsa del envase. No usar luego de la fecha de caducidad que figura en el envase.

5. Instrumento

El reactivo BD Tritest CD3/ CD16+ CD56/CD45 y los tubos BD Trucount están diseñados para usar en un citómetro de flujo equipado con el hardware y el software de computación adecuado. Recomendamos usar los citómetros de flujo BD FACSCalibur™, BD FACSort™ o BD FACScan™. Sin embargo, los resultados se pueden obtener con otras plataformas. El citómetro de flujo debe estar equipado con un láser de 488 nm para poder detectar la dispersión de la luz (frontal y lateral) y la fluorescencia de tres colores con una emisión que se pueda detectar en tres rangos: 515– 545 nm, 562– 607 nm y >650 nm. El instrumento debe poder generar un umbral o discriminar con el canal de >650 nm. Con este producto, se debe utilizar el cargador BD FACS Loader.

Recomendamos usar microesferas BD Calibrite™ y el software BD FACSComp™, versión 2.0 o posterior, para ajustar el voltaje del tubo fotomultiplicador (PMT) y la compensación de la fluorescencia y controlar la sensibilidad del instrumento antes de usarlo. Los usuarios de citómetros de flujo fabricados por otras empresas que no sean BD

deben consultar las instrucciones del fabricante para calibrar la inmunotipificación con tres colores.

BD también desarrolló aplicaciones como el software BD Multiset que calcula automáticamente los recuentos absolutos con los BD Trucount. Sin embargo, se pueden utilizar otros paquetes de software para la adquisición y el análisis de datos y los recuentos absolutos se pueden calcular manualmente.

6. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recolectar la sangre en condiciones de asepsia por venopunción^{25,26} en un tubo estéril para recolección de sangre BD Vacutainer® EDTA con tapón color lavanda. El reactivo CD3/CD16+CD56/CD45 y BD Trucount se validaron con fórmulas líquidas y deshidratadas de EDTA. Para este procedimiento se necesita como mínimo 100 µL de sangre entera. Siga las pautas del fabricante del tubo de recolección para el volumen mínimo de sangre que se recolectará para garantizar la dilución adecuada de la muestra, en especial cuando se determinan los recuentos absolutos con las microesferas BD Trucount.

Obtener un recuento de glóbulos blancos y un recuento diferencial de glóbulos blancos con la misma muestra de sangre entera antes de la tinción para garantizar que el recuento de glóbulos blancos esté dentro del rango lineal (consultar las Características de desempeño en la Sección 11: Linealidad) o para obtener recuentos absolutos a partir de porcentajes.

La sangre anticoagulada conservada a temperatura ambiente (20°C–25°C) se debe tincionar dentro de las 6 horas de la extracción; se debe analizar dentro de las 6 horas posteriores a la tinción.

Condiciones de interferencia

No use muestras del paciente previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre entera refrigeradas antes de la tinción pueden arrojar resultados anormales. Las muestras obtenidas de pacientes que toman inmunosupresores pueden alcanzar una resolución de baja calidad²⁷ Los blastocitos pueden interferir con los resultados de las ensayos. Las muestras hemolizadas se deben rechazar.

3. PROCEDIMIENTO

Reactivo suministrado

- BD Tritest CD3/CD16+ CD56/CD45 (Número de catálogo 340300), o
- BD Tritest CD3/CD16+ CD56/CD45 con BD Trucount (Número de catálogo 340403)

Reactivos y materiales requeridos pero que no se suministran

- Microesferas de 3 colores BD FACS (Número de catálogo 340486)
- Solución lisante BD FACS (10X), 100 mL (Número de catálogo 349202). Consultar las IU de la *solución lisante BD FACS* para conocer las instrucciones de dilución y las advertencias.
- Agua de grado reactivo (destilada o desmineralizada)
- Tubos para recolección de sangre BD Vacutainer EDTA o equivalentes
- Tubos de polistireno Falcon®* descartables para ensayos, con tapa, 12 x 75 mm o equivalentes (si no se utilizan los tubos BD Trucount)
- Agitador vorticial
- Micropipeteador con puntas
- Dispensador a granel o pipeta (450 µL) para administrar solución lisante BD FACS
- Solución envolvente BD FACSFlow™ (Número de catálogo 342003) o equivalente **CUIDADO** Use solo el diluyente de solución envolvente BD FACSFlow para diluir las microesferas BD Calibrite.
- Controles BD (Número de catálogo 340335), necesarios si usa BD Trucount
- Control del proceso de lisado de la sangre entera (disponible para la comercialización)

* Falcon es marca registrada de Corning Incorporated.

Tinción de las células

Los reactivos BD Tritest se pueden utilizar con o sin control de isotipos para evaluar la cantidad de anticuerpos no específicos unidos. Si quiere usar un control, está disponible el reactivo de control de isotipos BD Tritest™ IgG₁/IgG₁/CD45 (Número de catálogo 340385).

Lisar los eritrocitos luego de la tinción con la solución lisante BD FACS (1X) diluida. Proteja los tubos de la luz directa. Realizar el procedimiento a temperatura ambiente (20°C– 25°C). Consultar las Precauciones en la Sección 4, Condiciones de interferencia en la Sección 6

Pipeteo inverso

Si se utiliza BD Trucount, es fundamental agregar un volumen preciso de sangre para alcanzar el resultado. Si no se utiliza una pipeta electrónica de BD o similar a que suministra un volumen preciso de sangre, aplique la técnica de pipeteo inverso. Esta técnica aprovecha los dos toques de la pipeta.

- Para el pipeteo normal, el botón se presiona hasta el primer tope. La muestra se extrae soltando el botón. Luego se descarga presionando hasta el primer tope nuevamente.
- Para el pipeteo inverso, el botón se presiona hasta el segundo tope. Cuando se deja de apretar el botón, la muestra es absorbida por la punta. Se expulsa un volumen preciso presionando el botón hasta el primer tope. El exceso de muestra queda en la punta.

Tinción

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

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

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

2. Cargar con la pipeta 20 µL de BD Tritest CD3/ CD16+CD56/CD45 en el fondo del tubo.

Si usa un tubo BD Trucount, descargue la pipeta por encima del retenedor de acero inoxidable. No tocar el pellet.

3. Colocar con la pipeta 50 µL de sangre entera anticoagulada bien

mezclada en el fondo del tubo.

NOTA Evite manchar con sangre la pared del tubo. Si la sangre entera permanece en la pared del tubo, el reactivo no se tincionará.

Si usa un tubo BD Trucount, es fundamental que el procedimiento sea exacto. Usar una pipeta o la técnica de pipeteo inverso para descargar la muestra por la pared del tubo, justo por encima del retenedor.

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

Citometría de flujo

Si las muestras no se analizan de inmediato luego de la preparación, consérvelas lejos de la luz a temperatura ambiente.

Agitar bien las muestras (a baja velocidad) para reducir la compactación de las células antes de correrlas en el citómetro de flujo.²⁸ Si se usa el cargador BD FACS Loader, agite los tubos inmediatamente antes de colocarlos en las gradillas del cargador. Realice la adquisición y análisis de los datos en modo lista con la aplicación adecuada como el software BD CellQuest Pro o BD Multiset. Antes de adquirir las muestras, ajustar el umbral para minimizar los sedimentos y garantizar que queden incluidas las poblaciones de interés.

Control de calidad

Correr una muestra de control todos los días de un individuo adulto normal o un control de sangre entera comercial para optimizar los ajustes del instrumento y como control de la calidad del sistema.²⁶ El uso del control BD Tritest es optativo para activar los marcadores de fluorescencia con el fin de detectar tinción no específica.

Use controles comerciales con valores establecidos para porcentajes positivos y recuentos absolutos en cada corrida para evaluar el desempeño del sistema.

Inspeccione visualmente CD45 en el gráfico de puntos SSC. La población de linfocitos debe aparecer como un grupo compacto y brillante con una SSC baja. Los monocitos y los granulocitos deben también aparecer como grupos o clústeres separados. No siga con el análisis si las poblaciones son difusas o si la separación entre grupos es poca o inexistente.

Consultar la Figura 1, la Figura 2 y la Figura 3 para ver datos representativos de un individuo hematológicamente normal tincionada con CD3/ CD16+ CD56/CD45 en un tubo BD Trucount.

Figure 1 CD3 sin separar en CD45 en el gráfico de puntos SSC(1 = linfocitos CD45+)

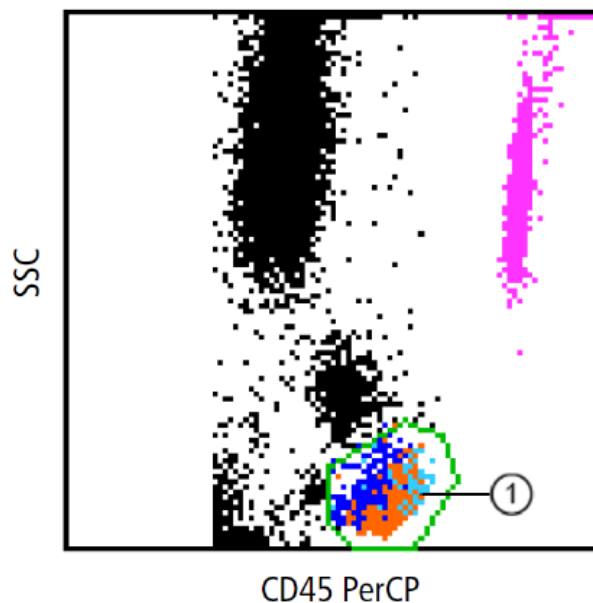


Figure 2 CD3 sin separar en el gráfico de puntos CD16+56 con los tubos BD Trucount con microesferas de recuento absoluto (1 = microesferas de recuento absoluto)

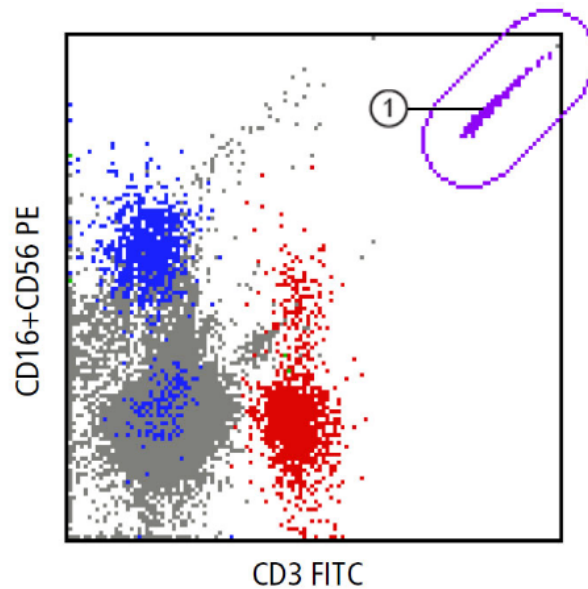
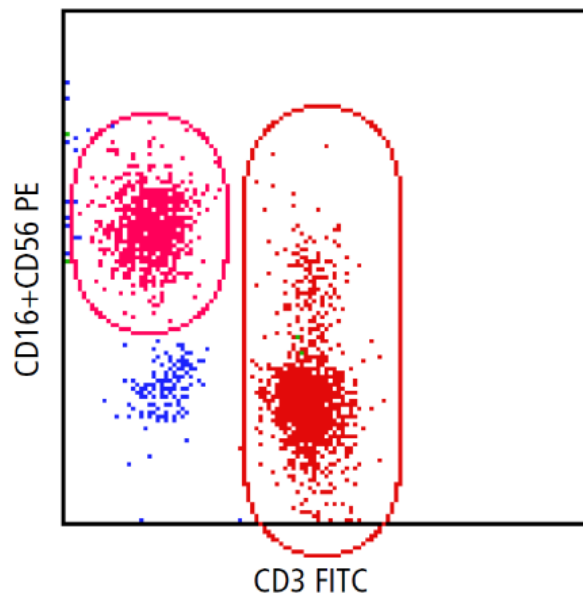


Figure 3 Linfocitos CD3 separado en el gráfico de puntos CD16+56



8. RESULTADOS

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

Cálculo de recuentos absolutos

Durante el análisis, se puede determinar la cantidad absoluta (células/ μL) de células positivas en la muestra comparando los eventos con células con los eventos con microsferas. Si se utiliza el software adecuado, como BD Multiset™, los recuentos absolutos se realizarán con el software. Si el análisis de datos se realiza en forma manual con el

software BD CellQuest™ u otro software, dividir la cantidad de eventos celulares positivos por la cantidad de eventos con microesferas y luego multiplicar por la concentración de microesferas en los tubos BD Trucount™.

Se puede obtener el recuento absoluto de células (A) con la siguiente ecuación:

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

- X es la cantidad de eventos celulares positivos
- Y es la cantidad de eventos con microesferas
- N es la cantidad de microesferas por ensayo, que se encuentran en el envase de los BD Trucount y puede variar entre lotes
- V es el volumen de las pruebas

9. LIMITACIONES

- Los laboratorios deben establecer sus propios rangos normales de referencia para los parámetros del reactivo BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45 que pueden ser afectados por el sexo y la edad del paciente y la técnica de preparación. El origen racial del paciente puede también tener incidencia,²⁹ si bien no existen suficientes datos para determinarla. Se deben conocer la edad, el sexo, las características clínicas y el origen racial de los pacientes cuando se establece un rango de referencia.³⁰ Los rangos de referencia se suministran solo con fines informativos.
- No se validó el uso del reactivo BD Tritest CD3/CD16+CD56/CD45 con los anticoagulantes de heparina líquida o solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD) para realizar los recuentos absolutos con los tubos BD Trucount.
- El reactivo BD Tritest CD3/CD16+CD56/CD45 no ha sido diseñado para evaluar muestras para la detección de células leucémicas para uso en la fenotipificación de muestras de pacientes con leucemia.
- Los recuentos absolutos no se pueden comparar entre laboratorios que usan equipos de fabricantes distintos.

10. VALORES PREVISTOS

Rangos de referencia

Los rangos de referencia para CD3/CD16+56/CD45 de la Tabla 1 se establecieron en el laboratorio de BD Biosciences en San Jose, California y en cuatro centros externos: Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH; Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD; Instituto de Medicina Tropical, Amberes, Bélgica; y la Universidad del Hospital de Carolina del Norte, Chapel Hill, Carolina del Norte.

Las edades de los individuos hematológicamente normales oscilaron entre los 18 y los 65 años de edad.

Tabla 1 Rangos de referencia representativos para los parámetros del reactivo CD3/CD16+CD56/CD45 en individuos adultos hematológicamente normales. Estos rangos de referencia están agrupados. Consultar la primera limitación para obtener más información sobre los rangos de referencia.

Población	n	Media	Percentil inferior a 2,5	Percentil superior a 97,5
Linfocitos NK (%)	448	13	5	27
Linfocitos T totales (%)	516	72	55	84
Linfocitos NK (células/ μ L) ^a	448	250	90	590
Linfocitos T totales (células/ μ L) ^a	516	1410	690	2540

a. Los valores absolutos se redondean a la concentración de 10 células/ μ L más próxima.


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

Tabla 2 Análisis de regresión

Población	n	Pendiente	Intersección	r	Rango
Linfocitos NK (%)	167	0,92	- 0,7%-positivo	0,95	2-53
Linfocitos T totales (%)	167	0,93	5,2%-positivo	0,96	26-94
Linfocitos NK (células/ μ L)	166	0,91	-1 células/ μ L	0,94	20– 750 ^a
Linfocitos T totales (células/ μ L)	166	0,94	109 células/ μ L	0,94	100– 3.790 ^a

a. Los valores absolutos se redondean a la concentración de 10 células/ μ L más próxima.

Estos rangos de referencia están agrupados. Consultar la primera limitación para obtener más información sobre los rangos de referencia.

11. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

Se estableció el desempeño de los reactivos mediante ensayos realizados en los laboratorios de BD Biosciences en San Jose, CA, en un centro clínico externo en los Estados Unidos de América o Europa o en una combinación de centros.

EXACTITUD

Los porcentajes de la población de linfocitos con el reactivo BD Tritest CD3/CD16+CD56/CD45 se comparó con los del reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56. Se compararon los recuentos absolutos con los resultados del reactivo BD Simultest CD3/CD16+CD56 y los recuentos de linfocitos obtenidos en un analizador de hematología.

Se analizaron alícuotas de la misma muestra de sangre de donantes con valores anormales y normales. El análisis de regresión de la Tabla 2 indica que los resultados son esencialmente equivalentes.

Reproducibilidad dentro de la muestra

Se evaluaron tres alícuotas de muestras provenientes de tres muestras que representan recuentos de CD4 altos, medios y bajos. Los resultados positivos %-fueron los siguientes (DE = desviación estándar):

- % CD3: media = 66, DE agrupada = 0,8

- % CD16+ CD56: media = 20, DE agrupada = 0,4

Los resultados para recuentos absolutos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3 Reproducibilidad dentro de la muestra para el reactivo BD Tritest CD3/CD16+CD56/CD45

Población	Nivel*	Media	DE	CV ^a (%)
Linfocitos natural killer (células/ μ L)	Alta	1.360	55	4,1
	Med	221	15	6,6
	Bajo	279	11	4,1
Linfocitos T totales (células/ μ L)	Alta	3.311	149	4,5
	Med	1.897	88	4,6
	Bajo	635	20	3,2

a. CV = coeficiente de variación

Estabilidad

Se realizó un estudio de estabilidad para evaluar el efecto del tiempo sobre las especificaciones de desempeño del reactivo BD Tritest. El estudio midió: 1) los cambios asociados con la conservación de la sangre entera antes de la tinción; 2) los cambios por el tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de datos, y e) la combinación de los dos.

Sobre la base de los resultados de este estudio, recomendamos tincionar y analizar las muestras dentro de las 6 horas de la extracción.

Reactividad cruzada

El antígeno anti-CD16 está expresado en los neutrófilos.² El antígeno anti-CD56 está presente en aproximadamente 5% de los linfocitos CD3+ en sangre periférica.²

Linealidad

Se evaluó la linealidad en una concentración de glóbulos blancos de $2,5 \times 10^3$ hasta 31×10^3 glóbulos blancos/ μ L y una concentración de linfocitos de $2,0 \times 10^2$ hasta $16,7 \times 10^3$

linfocitos/ μL . Se observó que los resultados fueron lineales en el rango CD3+CD16+CD56 (43 a $3,9 \times 10^3$ células/ μL) y en el rango CD3+ (122 a $11,2 \times 10^3$ células/ μL).

GARANTÍA

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

SOLO SE GARANTIZA LA CANTIDAD Y EL CONTENIDO INDICADO EN EL RÓTULO DEL PRODUCTO AL MOMENTO DE LA ENTREGA AL CLIENTE. POR LA PRESENTE, BD DECLINA SU RESPONSABILIDAD POR TODAS LAS OTRAS GARANTÍAS, EXPRESAS O IMPLÍCITAS, QUE INCLUYEN LA GARANTÍA DE COMERCIALIZACIÓN O NO VIOLACIÓN O DE IDONEIDAD PARA UN USO DETERMINADO. LA RESPONSABILIDAD EXCLUSIVA DE BD SE LIMITA AL REEMPLAZO DE LOS PRODUCTOS O EL REEMBOLSO DEL PRECIO DE COMPRA. BD NO ES RESPONSABLE POR LOS DAÑOS A LA PROPIEDAD NI POR DAÑOS ESPECIALES O INDIRECTOS, INCLUIDAS LAS LESIONES PERSONALES O LAS PÉRDIDAS ECONÓMICAS CAUSADAS POR EL PRODUCTO.

REFERENCIAS

1. Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T y otros. Definición de las células natural killer. Editores: Ades E, Lopez C. Células natural killer y mecanismos de defensa del huésped. Basel: Karger; 1989:1.
2. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. La relación de la expresión del antígeno anti-CD16 (Leu-11) y Leu-19 (NKH-1) en las células NK humanas de sangre periférica y los linfocitos T citotóxicos. J Immunol. 1986; 136:4480-4486.
3. Nicholson JKA, Jones BM, Hubbard M. Recuentos de linfocitos T con CD4 en muestras de sangre entera con un ensayo en un tubo individual con tres colores. Citometría. 1993; 14:685-689.
4. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Suplemento sobre los tres colores en las pautas NIAID DAIDS para inmunotipificación en la citometría de flujo. Citometría. 1996; 26:227-230.
5. Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Uso de la fluorescencia CD45 y de la dispersión lateral para separar linfocitos

- cuando se usa el procedimiento de lisado de la sangre entera y la citometría de flujo. *Citometría*. 1996; 26: 16- 21.
6. Haynes BF. Resumen de los estudios con células T realizado durante el Segundo Taller y Conferencia Internacional sobre Antígenos de Diferenciación en Leucocitos Humanos. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. *Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
 7. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Las subunidades con unión no covalente de 22 y 28 kd son asimiladas rápidamente por las células T que reaccionan con el anticuerpo Anti-Leu-4. *J Immunol*. 1983; 131:536-539.
 8. Knowles RW. Análisis inmunoquímico de los antígenos específicos para células T. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. *Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986; 1:259-288.
 9. Perussia B, Acuto O, Terhorst C y otros. Células natural killer humanas analizadas con B73.1., un anticuerpo monoclonal que bloquea las funciones de los receptores Fc, II; estudios de la interacción anticuerpo-antígeno B73.1 en la membrana de los linfocitos. *J Immunol*. 1983; 130:2142-2148.
 10. Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Células natural killer humanas analizadas con B73.1., un anticuerpo monoclonal que bloquea las funciones de los receptores Fc, I; caracterización de la población de linfocitos reactivo con B73.1. *J Immunol*. 1983; 130:2133-2141.
 11. Schmidt RE. Informe sobre natural killer sin linaje: clusters nuevos y previamente definidos. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. *Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:517-542.
 12. Ritz J, Trinchieri G, Lanier LL. Antígenos de las células NK: sección de informe. Editores: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W y otros. *Tipificación de leucocitos V: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos*. New York, NY: Oxford University Press; 1995; 2: 1367-1372.

13. Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Familia sin linaje, LFA-1 y antígenos comunes para leucocitos; clústeres nuevos y previamente definidos. Editores: McMichael AJ, ed. Tipificación de leucocitos III: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
14. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM y otros. Expresión citoplasmática del antígeno anti-CD3 como marcador diagnóstico para neoplasias de células T inmaduras. *Sangre*. 1988; 71:603-612.
15. Brenner MB, McClean J, Dialynas DP y otros. Identificación de un segundo receptor putativo de células T. *Nature*. 1986; 322:145-149.
16. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. El complejo e células T receptoras/CD3: un ensamble proteico dinámico. *Annu Rev Immunol*. 1988; 6:629-662.
17. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A y otros. Receptor Fc para IgG en células natural killer humanas: estudios fenotípicos, funcionales y comparativos con anticuerpos monoclonales. *J Immunol*. 1984; 133:180-189.
18. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Análisis molecular y funcional de la molécula de adhesión neural asociada con la célula natural killer humana (N-CAM/CD56). *J Immunol*. 1991; 146:4421-4426.
19. Schubert J, Lanier LL, Schmidt RE. Informe del cluster: CD56. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. *Tipificación de leucitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.
20. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Molécula de adhesión celular neural: estructura, dominios de tipo inmunoglobulina, modulación de la superficie celular y empalme alternativo del ARN. *Ciencia*. 1987; 236:799-806.
21. Schwinzer R. Informe del clúster: CD45/CD45R. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. *Tipificación de leucitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.

22. Centros para el Control de Enfermedades. Actualización sobre las perspectivas en la prevención de enfermedades y promoción de la salud: precauciones universales para la prevención en la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis B y otros patógenos de la sangre en entornos sanitarios. *MMWR*. 1988; 37:377-388.
23. *Protección del personal de laboratorio de las infecciones adquiridas en el ámbito laboral; Pautas aprobadas — Tercera edición*. Villanova, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2005. Documento CLSI M29-A3.
24. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivación de las células H9 infectadas con VIH en preparaciones de sangre entera con reactivos de lisis/fijación en la citometría de flujo. *J Immunol Methods*. 1993; 160:215-218.
25. *Procedimientos para la recolección de muestras de sangre con fines diagnósticos por venopunción: Estándar aprobado—Sexta edición*. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2007. Documento CLSI GP41-A6.
26. Enumeración de poblaciones de células definidas inmunológicamente mediante citometría de flujo; directrices aprobadas—Segunda edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2007. Documento CLSI H42-A2.
27. Giorgi JV. Mediciones del subgrupo de linfocitos: importancia en la medicina clínica. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL. *Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico*. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:236- 246.
28. Jackson AL, Warner NL. Preparación, tinción y análisis por citometría de flujo de leucocitos periféricos en la sangre.. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL. *Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico*. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:226- 235.
29. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influencia del origen racial en la distribución de las poblaciones de células T y de los linfocitos con Leu-11 positivo en

donantes de sangre sanos. *Inmunología diagnóstica*. 1985;3(1):33-37.

30. *Definición, establecimiento y verificación de los intervalos de referencia en el laboratorio clínico* —Tercera edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2007. Documento CLSI EP28 - A3c.


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



**BD Tritest CD3 FITC/
CD8 PE/CD45 PerCP**

Reactivo

50 ensayos por frasco **Número de catálogo
340344**

50 pruebas por frasco **Número de catálogo
con tubos BD 340406**
Trucount

Para obtener los porcentajes y los recuentos absolutos de linfocitos humanos T totales y linfocitos T supresores/citotóxicos en sangre entera con los eritrocitos lisados.

8/2010

23-3519-
04

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



**Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences**

San Jose, CA EE.UU. 95131

Teléfono 877.232.8995

Fax 408.954.2347

ClinicalApplications@bd.com



BENEX Limited

Rineanna House

Shannon Free Zone

Shannon, Condado de Clare

Irlanda


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

Teléfono 353.61.472920

Fax 353.61.472907

BD Biosciences

Soporte al cliente en Europa

Teléfono 32.2.400,9895

Fax 32.2.401,7094

help.biosciences@europe.bd.com

bdbiosciences.com

1. USO PREVISTO

BD Tritest™ CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD8 marcados con ficoeritrina (PE)/CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores para usar con un citómetro de flujo debidamente equipado. Se usa para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de los linfocitos humanos T maduros (CD3+) y de linfocitos T/supresores/citotóxicos (CD3+CD8+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. Cuando se usa con los tubos BD Trucount™ los recuentos absolutos de estas poblaciones se pueden obtener en un tubo individual.

El reactivo BD Tritest y los tubos BD Trucount se pueden usar con el cargador BD FACS™ Loader. El reactivo se puede usar con o sin un control de isotipo.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

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

Aplicaciones clínicas

Los linfocitos supresores/citotóxicos son una subpoblación de los linfocitos T (CD3+) que son CD8+. Los porcentajes o recuentos de CD3+CD8+ y CD3+CD4+ se utilizan para caracterizar y monitorear

algunas formas de inmunodeficiencia¹⁻³ y de enfermedades autoinmunes.^{4,5}

El porcentaje de linfocitos se encuentra fuera del rango normal de referencia en algunas enfermedades autoinmunes.⁶ El porcentaje relativo de la población CD8+ es elevado en muchos pacientes con deficiencias inmunes congénitas o adquiridas, como la inmunodeficiencia combinada grave (SCID, por su sigla en inglés)¹ o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).⁷

Los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) recomiendan el uso de combinaciones de reactivos con anticuerpos con CD3 y CD8 para determinar el porcentaje de linfocitos T CD8+ en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).⁸

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se agrega sangre entera al reactivo, los anticuerpos conjugados con el fluorocromo en el reactivo se unen específicamente a los antígenos de superficie del leucocito. Durante la adquisición, las células son impactadas por el haz de láser y la luz del láser se dispersa. Las células tincionadas producen fluorescencia. La dispersión y las señales de fluorescencia, que detecta el instrumento, brindan información sobre el tamaño de la célula, la complejidad interna y la intensidad relativa de la fluorescencia. Los reactivos de BD Tritest emplean la estimulación por fluorescencia, lo que permite el gating (separación) por fluorescencia directa de la población de linfocitos,⁹⁻¹¹ para reducir la contaminación con glóbulos rojos no lisados o nucleados en el gating. Cuando se utilizan los tubos BD Trucount, un volumen preciso de la muestra se tinciona directamente en un tubo BD Trucount. El pellet liofilizado del tubo se disuelve y se libera una cantidad determinada de microesferas fluorescentes. Durante el análisis, la cantidad absoluta (células/ μ L) de células positivas en la muestra se pueden determinar mediante la comparación de eventos con células en los eventos con microesferas. Si se utiliza el software adecuado, como BD Multiset™, los recuentos absolutos se determinarán con el software. Si el análisis de datos se realiza en forma manual con software como BD CellQuest™, dividir simplemente la cantidad de eventos

celulares positivos por la cantidad de eventos con microesferas y luego multiplicar por la concentración de microesferas en los tubos BD Trucount™.

4. REACTIVO

Reactivo suministrado, suficiente para 50 pruebas

El reactivo BD Tritest CD3/CD8/CD45 se suministra en 1 mL de solución salina tamponada con albúmina de suero bovino y ázida sódica (0,1%). Contiene CD3 marcado con FITC, clon SK7; ¹²⁻¹⁴ CD8 marcado con PE, clon SK1.;^{15,16} y CD45 marcado con PerCP, clon 2D1 (HLE-1). ¹⁷

CD 3 identifica los linfocitos T y reconoce la cadena épsilon del complejo TCR del antígeno anti-CD3/receptor del antígeno de las células T.¹⁸ Este complejo está compuesto por al menos 6 proteínas cuyo peso molecular oscila entre 20 y 30 kilodaltones (kDa).¹⁹ El antígeno reconocido con los anticuerpos anti-CD3 se asocia de manera no covalente con TCR α/β o γ/δ (70 a 90 kDa).²⁰

CD8 identifica a los linfocitos T supresores/citotóxicos y reconoce el antígeno expresado en α de 32-kDa de un complejo bimolecular con un puente de disulfuro²¹ El dominio citoplasmático de la subunidad del antígeno anti-CD8 está asociado con la proteína tirosina quinasa p56lck.²² La molécula de CD8 interactúa con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por su sigla en inglés) clase I, que aumenta la adhesión entre los linfocitos T CD8+ y las células diana.²³⁻²⁵ La unión de la molécula de CD8 a las moléculas MHC clase I refuerza la activación de los linfocitos T inactivados.²³⁻²⁵

CD45 identifica los leucocitos y reconoce el antígeno de los leucocitos humanos 180- a 220-kDa que forma parte de la familia de antígenos comunes de leucocitos (LCA, por su sigla en inglés).²⁶

Los anticuerpos anti-CD3, anti-CD8 y anti-CD45 están compuestos de cadenas pesadas murinas γ 1 y cadenas livianas kappa.

Los tubos BD Trucount contienen un pellet congelado en seco de microesferas fluorescentes en un tubo de uso único. Cada bolsa BD Trucount contiene 25 tubos, suficientes para 25 ensayos.

Precauciones

- Para uso en diagnósticos in vitro.

- No use el reactivo si observa algún cambio en el aspecto. La precipitación o la descoloración son indicio de inestabilidad o deterioro.
- El reactivo del anticuerpo contiene ázida sódica como conservante. Sin embargo, tenga cuidado de evitar la contaminación microbiana que puede arrojar resultados erróneos.

ADVERTENCIA La ázida sódica puede ser peligrosa si se ingiere (R22). Mantener alejado de la comida, bebida y el alimento para animales (S13). Usar indumentaria adecuada de protección (S36). En caso de ingestión, consultar al médico de inmediato y mostrar el envase o la etiqueta (S46). El contacto con ácidos produce gases muy tóxicos (R32). Los compuestos de ázida se deben enjuagar con abundante agua durante la eliminación para evitar que se deposite en las cañerías de plomo o cobre y donde se pueden desarrollar condiciones para una explosión.

- **ADVERTENCIA** Todas las muestras y los materiales biológicos con los que entra en contacto se consideran peligros biológicos. Manipular como si existiera la posibilidad de transmisión de infecciones ^{27,28} y eliminar con las precauciones adecuadas de acuerdo con las normas federales, estatales y locales. Nunca cargar la pipeta con la boca. Use indumentaria y guantes de protección adecuados. Se informó que la fijación desactiva el VIH. ²⁹
- Se debe usar la solución lisante BD FACS™ que contiene dietilenglicol y formaldehído. Consultar el inserto del envase para ver las advertencias.
- Si se utilizan tubos BD Trucount, es fundamental agregar un volumen preciso de sangre para lograr un resultado exacto. Calibrar las pipetas para que administren exactamente 50 µL de muestra o usar la técnica de pipeteo inverso (consultar el paso 3 de la página 5 para ver una breve descripción). Consultar las instrucciones del fabricante de la pipeta para más información.
- El recuento de microesferas varía por lote de los tubos BD Trucount. Es muy importante usar el recuento de microesferas del lote de los tubos BD Trucount que está en uso cuando se ingresa este valor en

el software o cuando se calcula un recuento absoluto de forma manual. No mezclar lotes de distintos tubos en el mismo ensayo.

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

Conservación y manipulación

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

5. INSTRUMENTO

El reactivo BD Tritest CD3/CD8/CD45 y los tubos BD Trucount están diseñados para usar en un citómetro de flujo equipado con el hardware y el software de computación adecuados. BD recomienda usar los citómetros de flujo BD FACSCalibur™, BD FACSort™ o BD FACScan™. Sin embargo, los resultados se pueden obtener con otras plataformas. El citómetro de flujo debe estar equipado con un láser de 488 nm capaz de detectar la dispersión de la luz (frontal y lateral) y la fluorescencia de tres colores con una emisión que se pueda detectar en tres rangos: 515- 545 nm, 562-607 nm y >650 nm. El instrumento debe poder limitar o discriminar con el canal de >650-nm. Con este producto, se debe utilizar el cargador BD FACS Loader.

Use las microesferas BD Calibrite™ y el software BD FACSCComp™, versión 2.0 o posterior, para ajustar el voltaje del tubo fotomultiplicador (PMT) y la compensación de la fluorescencia y controlar la sensibilidad del instrumento antes de usarlo. Los usuarios de citómetros de flujo fabricados por otras empresas distintas a BD deben consultar las instrucciones del fabricante para calibrar la inmunotipificación con cuatro colores.

BD también desarrolló aplicaciones de software, como el software BD Multiset, que calcula automáticamente los recuentos absolutos cuando se utilizan los tubos BD Trucount. Sin embargo, se pueden utilizar otros paquetes de software para la adquisición y el análisis de datos y los recuentos absolutos se pueden calcular manualmente.

6. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recolectar la sangre en condiciones de asepsia por venopunción^{30,31} en un tubo estéril para recolección de sangre BD Vacutainer® EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). El reactivo BD Multitest CD3/CD8/CD45 y los tubos BD Trucount se validaron con fórmulas líquidas y deshidratadas de EDTA.

Para este procedimiento se necesitan 100 µL de sangre entera. Siga las pautas del fabricante del tubo de recolección para el volumen mínimo de sangre que se recolectará para garantizar la dilución adecuada de la muestra, en especial cuando se realizan los recuentos absolutos con las microesferas BD Trucount.

Obtenga un recuento de glóbulos blancos y un recuento diferencial de glóbulos blancos con la misma muestra de sangre entera, antes de la tinción, para garantizar que el recuento de glóbulos blancos esté dentro del rango lineal para el instrumento correspondiente (ver Linealidad en la página 9), o calcule los recuentos absolutos a partir de los porcentajes.

La sangre anticoagulada conservada a temperatura ambiente (entre 20°C y 25°C) se debe tincionar dentro de las 48 horas de la extracción y se debe analizar dentro de las 6 horas de tinción. Si las muestras se tincionan dentro de las 24 horas de la extracción, se pueden analizar dentro de las 24 horas de la tinción.

Condiciones de interferencia

No usar muestras del paciente previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre entera refrigeradas antes de la tinción pueden arrojar resultados anormales. Las muestras obtenidas de pacientes que toman inmunosupresores pueden alcanzar una resolución de baja calidad³² Los blastocitos pueden interferir con los resultados de las ensayos. Se deben rechazar las muestras hemolizadas.

7. PROCEDIMIENTO

Reactivo suministrado

- BD Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP (Número de catálogo de BD 340344) o
- BD Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP con tubos BD Trucount (Número de catálogo de BD 340406)

Reactivos y materiales requeridos pero que no se suministran

- Microesferas de 3 colores BD Calibrite (Número de BD catálogo 340486)
- Solución lisante BD FACS (10X), 100 mL (Número de BD catálogo 349202)

Consultar las IU del inserto del envase para conocer las instrucciones de dilución y las advertencias.

- Agua de grado reactivo (destilada o desmineralizada)
- Tubos para recolección de sangre BD Vacutainer EDTA
- Tubos descartables para ensayos BD Falcon™ de polistireno con tapa, 12 x 75 mm (Número de catálogo de BD 352058) o equivalente si no usa tubos BD Trucount.
- Agitador vorticial
- Micropipeteador con puntas
- Dispensador a granel o pipeta (450 µL) para administrar solución lisante BD FACS
- Solución envolvente (BD FACSFlow™, Número de catálogo de BD 342003) o equivalente
- Controles BD Trucount (Número de catálogo BD 340335), necesarios si usa tubos BD Trucount

- Control del proceso de lisado de la sangre entera (disponible para la comercialización)

Tinción de las células

Los reactivos BD Tritest se pueden utilizar con o sin control de isotipos para evaluar la cantidad de anticuerpos no específicos unidos. Si quiere usar un control, está disponible el reactivo de control de isotipos BD Tritest γ 1/ γ 1/CD45 (Número de BD catálogo 340385).

Tinción

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

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

NOTA Antes de usar, verifique que el pellet de la microesfera BD Trucount esté intacto y dentro del retenedor de metal en el fondo del tubo. Caso contrario, descartar el tubo BD Trucount y reemplazarlo por otro. No transferir microesferas a otro tubo.

2. Cargar con la pipeta 20 μ L de BD Tritest CD3/ CD8/CD45 en el fondo del tubo
3. Si usa un tubo BD Trucount, descargue la pipeta por encima del retenedor de acero inoxidable. No tocar el pellet.
4. Colocar con la pipeta 50 μ L de sangre entera anticoagulada bien mezclada en el costado del tubo justo por encima del retenedor.

NOTA Evite manchar con sangre la pared del tubo. Si la sangre entera permanece en la pared del tubo, no se tincionará con el reactivo y esto puede afectar los resultados.

Es fundamental ser exacto en el manejo de la pipeta cuando se usa un tubo BD Trucount. Usar la técnica de pipeteo inverso para descargar la muestra con la pipeta en la pared del tubo justo por encima del retenedor.

Para el pipeteo inverso, presione el botón hasta el segundo tope. Cuando suelta el botón, el exceso de muestra es absorbida por la punta. Presionar el botón hasta el primer tope para expulsar un volumen exacto de la muestra; el exceso de muestra queda en la

punta.

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

La muestra está lista para el análisis en el citómetro de flujo.

Citometría de flujo

Si las muestras no se analizan de inmediato luego de la tinción, consérvelas lejos de la luz a temperatura ambiente (20°C–25°C).

Agitar bien las muestras (a baja velocidad) para reducir la compactación de las células antes de correrlas en el citómetro de flujo.³³ Si usa el cargador BD FACS Loader, agite los tubos inmediatamente antes de colocarlos en las gradillas del cargador. Obtener y analizar los datos con la aplicación adecuada, como el software BD CellQuest o BD Multiset. Antes de adquirir las muestras, ajustar el umbral para reducir al mínimo los sedimentos y garantizar que queden incluidas las poblaciones de interés.

Control de calidad

Correr una muestra de control todos los días de un individuo adulto normal o un control de sangre entera comercial para optimizar los ajustes del instrumento y como control de la calidad del sistema.³¹ El uso del isotipo de control BD Tritest es optativo para activar los marcadores de fluorescencia con el fin de detectar tinción no específica.

Usar controles comerciales con valores establecidos para porcentajes positivos y recuentos absolutos en cada corrida para evaluar el desempeño del sistema.

Inspeccione visualmente CD45 en el gráfico de puntos SSC. La población de linfocitos debe aparecer como un grupo compacto y brillante con una SSC baja. Los monocitos y los granulocitos deben también aparecer como grupos separados. No siga con el análisis si las

poblaciones son difusas o si la separación entre grupos es poca o inexistente.

Consultar la Figura 1, la Figura 2 y la Figura 3 (página 7) para ver datos representativos de un individuo hematológicamente normal tincionada con BD Tritest CD3/CD8/CD45 en un tubo BD Trucount.

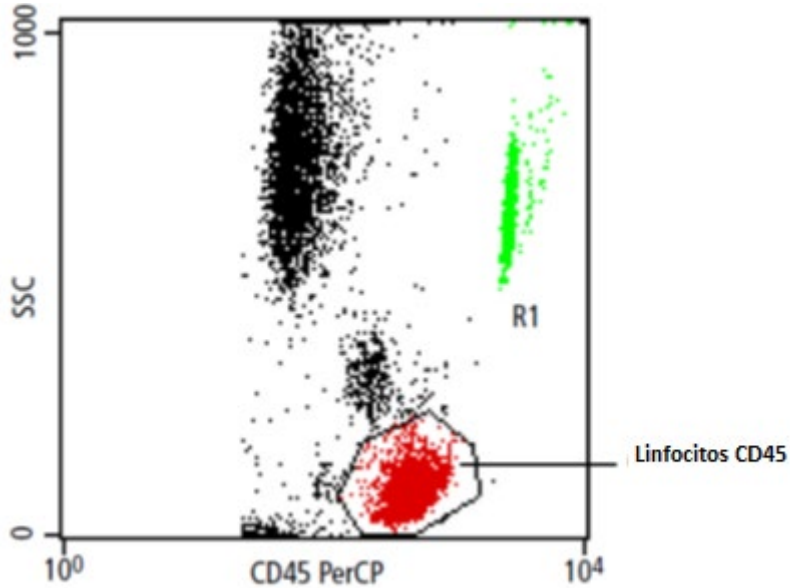


Figure 1 Gráfico de puntos CD45 sin separar vs SSC

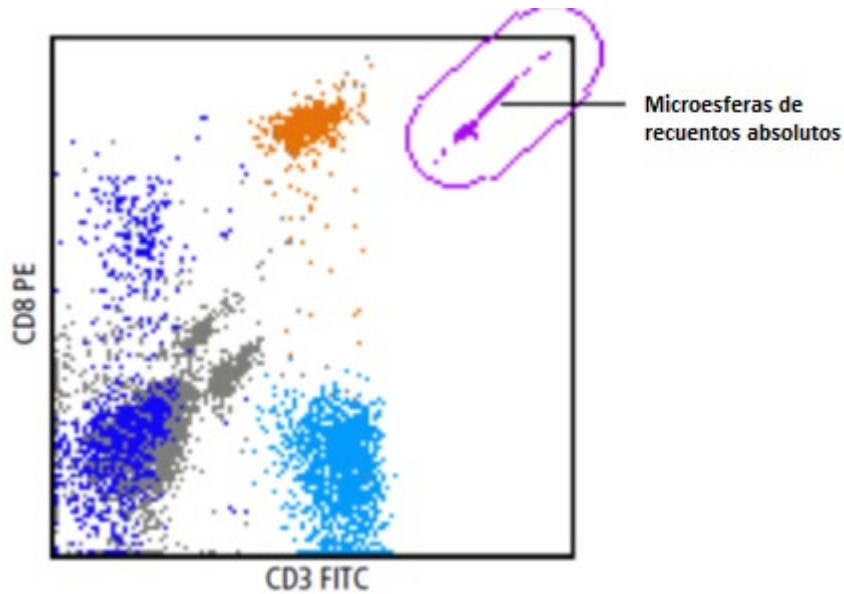


Figure 2 Gráfico de puntos CD3 sin separar vs CD8

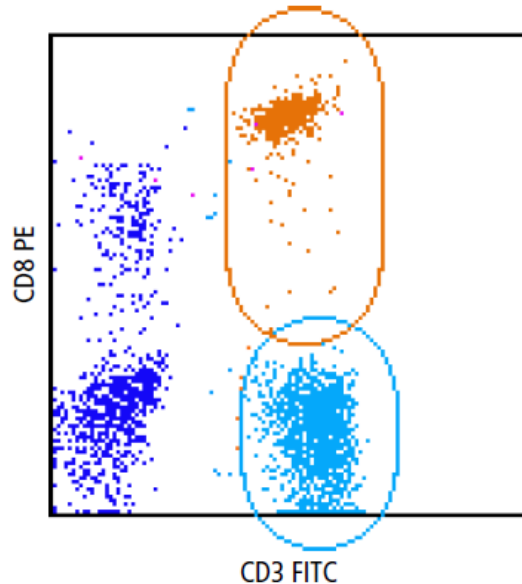


Figura 3 Gráfico de puntos CD3 vs CD8 con linfocitos separados

8. RESULTADOS

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

Cálculo de recuentos absolutos

Durante el análisis, la cantidad absoluta (células/ μL) de células positivas en la muestra se pueden determinar mediante la comparación de eventos con células en los eventos con microesferas. Si se utiliza el software BD Multiset, los recuentos absolutos se determinarán automáticamente.

Si el análisis de datos se realiza en forma manual con software como BD CellQuest™, dividir simplemente la cantidad de eventos celulares positivos por la cantidad de eventos con microesferas y luego multiplicar por la concentración de microesferas en los tubos BD Trucount™.

$$\frac{\text{cantidad de eventos en la población celular}}{\# \text{ cantidad de eventos en el área de la microesferas en los recuentos absolutos}} \times \frac{\text{cantidad de microesferas/ensayo}^*}{\text{volumen del ensayo}} = \text{recuento absoluto de población celular}$$

* Este valor se encuentra en el rótulo del envase de los tubos BD Trucount y puede variar entre lotes.

9. LIMITACIONES

- Los laboratorios deben establecer sus propios rangos normales de referencia para los parámetros del reactivo BD Tritest CD3/CD8/CD45 que pueden ser afectados por el sexo y la edad del paciente y la técnica de preparación. El origen racial del paciente³⁴ y las variaciones individuales en la expresión del epitopo³⁵ también pueden tener un efecto, si bien no existen suficientes datos para determinarlo. Se deben conocer la edad, el sexo, las características clínicas y el origen racial de los pacientes cuando se establece un rango de referencia.³⁶ Los rangos de referencia se suministran solo con fines informativos.
- BD Biosciences no validó el uso del reactivo BD Tritest CD3/CD8/CD45 con los anticoagulantes de heparina líquida o solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD) para realizar los recuentos absolutos con los tubos BD Trucount.
- El reactivo BD Tritest CD3/CD8/CD45 no ha sido diseñado para evaluar muestras para la detección de células leucémicas para uso en la fenotipificación de muestras de pacientes con leucemia.
- Los recuentos absolutos no se pueden comparar entre laboratorios que usan s equipos de fabricantes distintos.

10. VALORES PREVISTOS

Rangos de referencia

Los rangos de referencia para CD3/CD8/CD45 de la Tabla 1 se establecieron en el laboratorio de BD Biosciences en San Jose, California y en cuatro centros externos: Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH; Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD; Instituto de Medicina Tropical, Amberes, Bélgica; y la Universidad del Hospital de Carolina del Norte, Chapel Hill, Carolina del Norte. Las edades de los individuos hematológicamente normales oscilaron entre los 18 y los 65 años de edad.

Estos rangos de referencia están agrupados. Para información detallada sobre los rangos de referencia obtenidos con este estudio,

comuníquese con el Soporte a Clientes de BD. Consultar la primera limitación para obtener más información sobre los rangos de referencia.

11. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

Se estableció el desempeño de los reactivos mediante ensayos realizados en los laboratorios de BD Biosciences en San Jose, CA, en un centro clínico externo en los Estados Unidos de América o Europa o en una combinación de centros.

Tabla 1 Rangos de referencia representativos en adultos hematológicamente normales para BD Tritest CD3/CD8/CD45.

Población	n	Media	Percentil inferior a 2,5	Percentil superior a 97,5
Linfocitos T supresores/citotóxicos (%)	523	25	13	41
Linfocitos T totales (%)	516	72	55	84
Linfocitos T supresores/citotóxicos (células/ μ L) ^a	523	490	190	1140
Linfocitos T totales (células/ μ L) ^a	516	1410	690	2540

a. Valores absolutos redondeados a la concentración 10 células/ μ L más próxima.

Exactitud

Los porcentajes de la población de linfocitos con el reactivo BD Tritest CD3/CD8/CD45 se comparó con los del reactivo BD Simultest™ CD3/CD8. Los recuentos absolutos se compararon con los resultados del instrumento BD FACSCount™. Se analizaron alícuotas de la misma muestra de sangre de donantes con valores anormales y anormales. El análisis de regresión de la Tabla 2 indica que los resultados son esencialmente equivalentes.


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

Tabla 2 Análisis de regresión

Subconjunto	n	Pendiente	Intersección	r	Rango
Linfocitos T supresores/citotóxicos (%)	168	0,98	0,2%– positivo	0,99	15– 84
Linfocitos T totales (%)	168	0,92	6,3%– positivo	0,97	26– 94
Linfocitos T supresores/citotóxicos (células/ μ L)	194	1,06	-10 células/ μ L	0,98	70– 1.980 ^a
Linfocitos T totales (células/ μ L)	197	1,04	-11 células/ μ L	0,98	120– 2.860 ^a

a. Valores absolutos redondeados a la concentración 10 células/ μ L más próxima.

Reproducibilidad dentro de la muestra

Se evaluaron tres alícuotas de muestras provenientes de tres muestras que representan conteos de CD4 altos, medios y bajos. Los resultados positivos %-fueron los siguientes (DE = desviación estándar):

- % CD3: media = 71, DE agrupada = 1,1
- % CD8: media = 22, DE agrupada = 1,0

Los resultados para recuentos absolutos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3 Reproducibilidad dentro de la muestra para el reactivo BD Tritest CD3/CD8/CD45

Población	Nivel	Media	DE	%CV
Linfocitos T supresores/citotóxicos (células/ μ L)	Alta	713	82,2	11,5
	Med	455	27,5	6,1
	Bajo	321	29,9	9,3
Linfocitos T totales (células/ μ L)	Alta	2.734	262,70	9,6
	Med	1.851	84,9	4,6
	Bajo	708	51,2	7,2

Estabilidad

Se realizó un estudio de estabilidad para evaluar el efecto del tiempo sobre las especificaciones de desempeño del reactivo BD Tritest. El estudio midió: 1) los cambios asociados con la conservación de la sangre entera antes de la tinción; 2) los cambios por el tiempo

transcurrido entre la tinción y la adquisición de datos, y 3) la combinación de los dos.

Sobre la base de los resultados de este estudio, recomendamos tincionar las muestras dentro de las 48 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 6 horas de la tinción o tincionar las muestras dentro de las 24 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 24 horas de la tinción.

* Datos disponibles en BD Biosciences

Reactividad cruzada

El anticuerpo anti-CD8 reacciona con los linfocitos NK³⁷ y con los linfocitos T supresores/citotóxicos.

Linealidad

Se evaluó la linealidad en una concentración de glóbulos blancos de $2,5 \times 10^3$ hasta 31×10^3 glóbulos blancos/ μL y una concentración de linfocitos de $2,0 \times 10^2$ hasta $16,7 \times 10^3$ linfocitos/ μL . Se observó que los resultados fueron lineales en el rango CD3+CD8 (43 a $3,9 \times 10^3$ células/ μL) y en el rango CD3+ (122 a $11,2 \times 10^3$ células/ μL).

GARANTÍA

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

SOLO SE GARANTIZA LA CANTIDAD Y EL CONTENIDO INDICADO EN EL RÓTULO DEL PRODUCTO AL MOMENTO DE LA ENTREGA AL CLIENTE. POR LA PRESENTE, BD DECLINA SU RESPONSABILIDAD POR TODAS LAS OTRAS GARANTÍAS, EXPRESAS O IMPLÍCITAS, QUE INCLUYEN LA GARANTÍA DE COMERCIALIZACIÓN O NO VIOLACIÓN O DE IDONEIDAD PARA UN USO DETERMINADO. LA RESPONSABILIDAD EXCLUSIVA DE BD SE LIMITA AL REEMPLAZO DE LOS PRODUCTOS O EL REEMBOLSO DEL PRECIO DE COMPRA. BD NO ES RESPONSABLE POR LOS DAÑOS A LA PROPIEDAD NI POR DAÑOS ESPECIALES O INDIRECTOS, INCLUIDAS LAS LESIONES PERSONALES O LAS PÉRDIDAS ECONÓMICAS CAUSADAS POR EL PRODUCTO.

REFERENCIAS

1. Schmidt RE. Anticuerpos monoclonales para diagnóstico de inmunodeficiencias. Blut. 1989; 59:200-206.
2. Nicholson JKA. Uso de la citometría de flujo en la evaluación y el diagnóstico de enfermedades de inmunodeficiencia primaria y secundaria. Arch Pathol Lab Med. 1989; 113:598-605.
3. Foucar K, Goeken JA. Aplicación clínica de las técnicas inmunológicas en el diagnóstico de trastornos linfoproliferativos y de inmunodeficiencia. Laboratorio Médico. 1982; 13:403-413.
4. Cohen SB, Weetman AP. Linfocitos intersticiales e intraepiteliales activados en la enfermedad autoinmune de tiroides. Acta Endocrinol. 1988; 119:161-166.
5. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneidad de las poblaciones de células T inmunoregulatorias en el lupus eritematoso sistémico; correlación con las características clínicas. Am J Med. 1982; 72:783-790.
6. Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Función celular del supresor defectuoso mediada por líneas de células T8+ cde pacientes con esclerosis múltiple progresiva. J Immunol. 1986; 137:3436-3439.
7. Giorgi JV, Hultin LE. Alteraciones en las poblaciones de linfocitos e inmunofenotipificación por citometría de flujo en la enfermedad por VIH. Boletín de Inmunología Clínica. 1990;10:55-61.
8. Centros para el Control de Enfermedades. 1997 Pautas revisadas para realizar determinaciones de las células CD4+ T en personas con virus de inmunodeficiencia humana (VIH). MMWR. 1997;46(No. RR-2):1-29.
9. Nicholson JKA, Jones BM, Hubbard M. Recuentos de linfocitos T con CD4 en muestras de sangre entera con un ensayo en un tubo individual con tres colores. Citometría. 1993; 14:685-689.
10. Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Uso de la fluorescencia CD45 y de la dispersión lateral para separar linfocitos cuando se usa el procedimiento de lisado de la sangre entera y la citometría de flujo. Citometría. 1996; 26:16-21.
11. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Suplemento sobre los tres colores en las pautas NIAID DAIDS para inmunotipificación en la citometría de flujo. Citometría. 1996; 26:227-230.

12. Haynes BF. Resumen de los estudios con células T realizado durante el Segundo Taller y Conferencia Internacional sobre Antígenos de Diferenciación en Leucocitos Humanos. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T. New York, NY: Springer-Verlag; 1986; 1:3-30.
13. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Las subunidades con unión no covalente de 22 y 28 kd son asimiladas rápidamente por las células T que reaccionan con el anticuerpo Anti- Leu-4. J Immunol. 1983; 131:536-539.
14. Knowles RW. Análisis inmunoquímico de los antígenos específicos para células T. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T. New York, NY: Springer-Verlag; 1986; 1:259-288.
15. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD y otros. Antígenos de la membrana dependientes del timo en hombres; inhibición de limfólisis mediada por células mediante anticuerpos monoclonales para el antígeno TH2. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 1981; 78:544-548.
16. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Informe conjunto del primer taller internacional sobre los antígenos de diferenciación para leucocitos humanos realizado por investigadores de los laboratorios participantes: Protocolo para T2. Editores: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF. Tipificación de leucocitos. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:25-60.
17. Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Familia sin linaje, LFA-1 y antígenos comunes para leucocitos; clústeres nuevos y previamente definidos. Editores: McMichael AJ, ed. Tipificación de leucocitos III: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
18. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM y otros. Expresión citoplasmática del antígeno anti-CD3 como marcador diagnóstico para neoplasias de células T inmaduras. Sangre. 1988; 71:603-612.
19. Brenner MB, McClean J, Dialynas DP y otros. Identificación de un segundo receptor putativo de células T. Nature. 1986; 322:145-

- 149.
20. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. El complejo e células T receptoras/CD3: un ensamble proteico dinámico. *Annu Rev Immunol* 1988;6:629-662.
 21. Moebius U. Informe del clúster: CD8. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
 22. Rudd CE, Burgess KE, Barber EK, Schlossman SF. Anticuerpos monoclonales para las cantidades variables de precipitado de antígenos anti-CD4 y anti-CD8 de la actividad de p56lck asociada con CD4/CD8. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV, antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:326-327.
 23. Gallagher PF, Fazekas de St. Groth B, Miller JFAP. Las moléculas de CD4 y de CD8 se pueden asociar físicamente con el mismo receptor de las células T. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 1989; 86:10044-10048.
 24. Anderson P, Blue M-L, Morimoto C, Schlossman SF. El entrecruzamiento de T3 (CD3) con T4 (CD4) favorece la proliferación de linfocitos T inactivados. *J Immunol.* 1987; 139:678-682.
 25. Eichmann K, Jönsson J-I, Falk I, Emrich F. Activación efectiva de los linfocitos T murinos inactivados mediante el entrecruzamiento de concentraciones submitogénicas de los receptores del antígeno de las células T con Lyt-2 o L3T4. *Eur J Immunol.* 1987; 17:643-650.
 26. Schwinzer R. Informe del clúster: CD45/CD45R. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
 27. Protección del personal de laboratorio de las infecciones adquiridas en el ámbito laboral-Segunda edición; Pauta aprobada. Villanova, PA: Comité Nacional de Estándares Clínicos para Laboratorios; 2001. Documento NCCLS M29-A2.

28. Centros para el Control de Enfermedades. Actualización: precauciones universales para la prevención en la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis B y otros patógenos de la sangre en entornos sanitarios. MMWR. 1988; 37:377-388.
29. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivación de las células H9 infectadas con VIH en preparaciones de sangre entera con reactivos de lisis/fijación en la citometría de flujo. J Immunol Methods. 1993; 160:215-218.
30. Procedimientos para la recolección de muestras de sangre con fines diagnósticos por venopunción; Cuarta edición - Estándar aprobado. Wayne, PA: Comité Nacional de Estándares Clínicos para Laboratorios; 1998. Documento NCCLS H3-A4.
31. Aplicaciones clínicas de la citometría de flujo: Garantía de calidad e inmunotipificación de los linfocitos: Pauta aprobada. Wayne, PA: Comité Nacional de Estándares Clínicos para Laboratorios; 1998. Documento NCCLS H42-A.
32. Giorgi JV. Mediciones de las poblaciones de linfocitos: importancia en la medicina clínica. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL. Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:236- 246.
33. Jackson AL, Warner NL. Preparación, tinción y análisis por citometría de flujo de leucocitos periféricos en la sangre.. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL. Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:226- 235.
34. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influencia del origen racial en la distribución de las poblaciones de células T y de los linfocitos con Leu-11 positivo en donantes de sangre sanos. Inmunología diagnóstica. 1985;03:33-37.
35. Angadi CV. Ausencia de epitope Leu-3a en los linfocitos colaboradores T (CD4). J Clin Lab Anal. 1990; 4:193-195.
36. Cómo definir y determinar los intervalos de referencia en el

- laboratorio clínico; Pauta aprobada —Segunda edición. Wayne, PA: Comité Nacional de Estándares Clínicos para Laboratorios; 2000. Documento NCCLS C28-A2.
37. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpoblaciones de células humanas natural killer definidas por la expresión de los antígenos Leu-7 (HNK-1) y Leu-11 (NK-15). J Immunol. 1983; 131:1789-1796.


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



BD Tritest™ CD3/CD19/ CD45

Para obtener los porcentajes y los recuentos absolutos de linfocitos humanos T totales y linfocitos B en sangre entera con los eritrocitos lisados.

Pruebas	N.º de catálogo 364902
50 ensayos	340381
50 ensayos con tubos BD Trucount	340405

2/2018

23-3025-06

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

**Solo con
receta**

© 2018 BD. La marca BD, el logotipo de BD y todas las otras marcas registradas pertenecen a Becton, Dickinson and Company.

■ Becton, Dickinson and Company

BD Biosciences

2350 Qume Drive

San Jose, CA EE.UU. 95131 EE.UU.

Distribuidores en Australia y Nueva Zelanda:

Becton Dickinson Pty Ltd.

4 Research Park Drive

Macquarie University Research Park

North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited

14b George Bourke Drive

Mt Wellington

Auckland 1060

Nueva Zelanda

bdbiosciences.com

ClinicalApplications@bd.com**1. USO PREVISTO**

BD Tritest™ CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD19 marcado con ficoeritrina (PE)/CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores para usar con un citómetro de flujo debidamente equipado. Se usa para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de las de linfocitos humanos T maduros (CD3+) y de linfocitos B (CD19+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. Cuando se usa con los tubos BD Trucount™ los recuentos absolutos de estas poblaciones se pueden obtener en un tubo individual.

Los tubos BD Trucount se pueden usar con el cargador BD FACS™ Loader. El reactivo se puede usar con o sin un control de isotipo.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

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

Aplicaciones clínicas

Los porcentajes o recuentos de Linfocitos T y CD3+CD4+ se utilizan para caracterizar y monitorear algunas formas de inmunodeficiencia¹⁻³ y de enfermedades autoinmunes.^{4,5}

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se agrega sangre entera al reactivo, los anticuerpos conjugados con el fluorocromo en el reactivo se unen específicamente a los antígenos de superficie del leucocito. Durante la adquisición, las células son impactadas por el haz de láser y la luz del láser se dispersa. Las células tincionadas producen fluorescencia. La dispersión y las señales

de fluorescencia, que detecta el instrumento, brindan información sobre el tamaño de la célula, la complejidad interna y la intensidad relativa de la fluorescencia. Los reactivos de BD Tritest emplean la estimulación por fluorescencia, lo que permite el gating (separación) por fluorescencia directa de la población de linfocitos,⁶⁻⁸ para reducir la contaminación con glóbulos rojos no lisados o nucleados en el gating.

Cuando se utilizan los tubos BD Trucount, se tinciona un volumen predeterminado de la muestra directamente en un tubo BD Trucount. El pellet liofilizado del tubo se disuelve y se libera una cantidad determinada de microesferas fluorescentes. Durante el análisis, la cantidad absoluta (células/ μ L) de células positivas en la muestra se pueden determinar mediante la comparación de eventos con células en los eventos con microesferas. Si se utiliza el software adecuado, como BD Multiset™, los recuentos absolutos se determinarán con el software. Si el análisis de datos se realiza en forma manual con software como BD CellQuest™ Pro, dividir simplemente la cantidad de eventos celulares positivos por la cantidad de eventos con microesferas y luego multiplicar por la concentración de microesferas en los tubos BD Trucount™.

4. REACTIVO

Reactivo suministrado, suficiente para 50 pruebas

El reactivo BD Tritest CD3/CD19/CD45 se suministra en 1 mL de solución salina tamponada con albúmina de suero bovino y ázida sódica (0,1%). Contiene CD3 marcado con FITC, clon SK7;⁹⁻¹¹ CD19 marcado con PE, clon SJ25C1.;¹² y CD45 marcado con PerCP, clon 2D1 (HLe-1).¹³

CD 3 identifica los linfocitos T y reconoce la cadena épsilon del complejo (TRC) del antígeno anti-CD3/receptor del antígeno de las células T.¹⁴ Este complejo está compuesto por al menos 6 proteínas cuyo peso molecular oscila entre 20 y 30 kilodaltones (kDa).¹⁵ El antígeno reconocido con los anticuerpos anti-CD3 se asocia de manera no covalente con el TCR α/β o γ/δ (70 a 90 kDa).¹⁶

CD19 identifica los linfocitos B y reconoce un antígeno de 90-kDa que está presente en los linfocitos humanos B en todos los estadios de maduración, si bien se pierde en las células de plasma.¹⁷ El antígeno

anti-CD19 puede participar en la activación y proliferación de los linfocitos B.¹⁷

CD45 identifica leucocitos y reconoce el antígeno de los leucocitos humanos de 180- a 220-kDa que forma parte de la familia de antígenos comunes de leucocitos (LCA, por su sigla en inglés).¹⁸

Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD45 están compuestos de cadenas pesadas murinas $\gamma 1$ y cadenas livianas kappa.

Los tubos BD Trucount contienen un pellet congelado en seco de microesferas fluorescentes en un tubo de uso único. Cada bolsa BD Trucount contiene 25 tubos, suficientes para 25 ensayos.

Los valores de concentración se enumeran en la siguiente tabla:

Reactivo	reactivo ($\mu\text{g/mL}$)
CD3 FITC	2,0
CD19 PE	2,0
CD45 PerCP	6,25

Precauciones

- Para uso en diagnósticos in vitro.
- No use el reactivo si observa algún cambio en el aspecto. La precipitación o la descoloración indican inestabilidad o deterioro.
- El reactivo del anticuerpo contiene ázida sódica como conservante. Sin embargo, tenga cuidado de evitar la contaminación microbiana que puede arrojar resultados erróneos.
- **ADVERTENCIA** Todas las muestras y los materiales biológicos con los que entra en contacto se consideran peligros biológicos. Manipular como si existiera la posibilidad de transmisión de infecciones ^{19,20} y eliminar con las precauciones adecuadas de acuerdo con las normas federales, estatales y locales. No pipetear con la boca. Use indumentaria, gafas y guantes de protección adecuados. Se informó que la fijación desactiva el VIH. ²¹
- Se debe usar la solución lisante BD FACS™ que contiene dietilenglicol y formaldehído. Consultar las instrucciones de uso (IU) de la solución lisante BD FACS para conocer las advertencias.
- Si se utilizan los tubos BD Trucount, es fundamental agregar un

volumen preciso de sangre para alcanzar el resultado. Las pipetas se deben calibrar para administrar exactamente 50 µL de muestra. Se puede conseguir una pipeta electrónica que funciona en modo de pipeteo inverso a través de BD. Si no se utiliza esta pipeta o una similar, utilice la técnica de pipeteo inverso (consultar Pipeteo inverso en la Sección 7 para ver una breve descripción). Consultar las instrucciones del fabricante de la pipeta para más información.

- El recuento de microesferas varía por lote de los tubos BD Trucount. Es muy importante usar el recuento de microesferas del lote de los tubos BD Trucount que está en uso cuando se ingresa este valor en el software o cuando se calcula un recuento absoluto de forma manual. No mezclar lotes de distintos tubos en el mismo ensayo.
- Los tubos BD Trucount están diseñados para usar con un procedimiento específico de lavado/no lavado. No intente fijar un umbral en la dispersión frontal (FSC) para la recopilación de datos.

Conservación y manipulación

- Conservar el reactivo a una temperatura de 2°C- 8°C. No use luego de la fecha de caducidad del rótulo.
- No congele el reactivo ni lo exponga a la luz directa durante la conservación o la incubación con células. Mantenga el frasco con el reactivo seco.
- Conservar los tubos BD Trucount en la bolsa original de papel metalizado a una temperatura de 2°C- 25°C. Para evitar la condensación potencial, abrir la bolsa solo luego de que se alcanzó la temperatura ambiente y volver a sellar con cuidado la bolsa luego de retirar el tubo. Examine el desecante cada vez que abre la bolsa. Si el color del desecante cambió de azul a lavanda, descarte el resto de los tubos. Usar los tubos dentro de la hora luego de retirar la bolsa del envase. No usar luego de la fecha de caducidad que figura en el envase.

5. INSTRUMENTO

El reactivo BD Tritest CD3/CD19/CD45 y los tubos BD Trucount están diseñados para usar en citómetros de flujo equipados con el hardware y el software de computación adecuado. Recomendamos usar los citómetros de flujo BD FACSCalibur™, BD

FACSort™ o BD FACScan™. Sin embargo, los resultados se pueden obtener con otras plataformas. El citómetro de flujo debe estar equipado con un láser de 488 nm y capaz de detectar la dispersión de la luz (frontal y lateral) y la fluorescencia de tres colores con una emisión que se pueda detectar en tres rangos: 515–545 nm, 562-607 nm y >650 nm. El instrumento debe poder limitar o discriminar con el canal de >650-nm. Con este producto, se debe utilizar el cargador BD FACS Loader.

Recomendamos usar microesferas BD Calibrite™ y el software BD FACSComp™, versión 2.0 o posterior, para ajustar el voltaje del tubo fotomultiplicador (PMT) y la compensación de la fluorescencia y controlar la sensibilidad del instrumento antes de usarlo. Los usuarios de citómetros de flujo fabricados por otras empresas distintas a BD deben consultar las instrucciones del fabricante para calibrar la inmunofenotipificación con cuatro colores.

BD también desarrolló aplicaciones como el software BD Multiset que calcula automáticamente los recuentos absolutos con los tubos BD Trucount. Sin embargo, se pueden utilizar otros paquetes de software para la adquisición y el análisis de datos y los recuentos absolutos se pueden calcular manualmente.

6. PREPARACIÓN Y RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Recolectar la sangre en condiciones de asepsia por venopunción^{22,23} en un tubo estéril para recolección de sangre BD Vacutainer® EDTA con tapón color lavanda. El reactivo BD Multitest CD3/CD19/CD45 y los tubos BD Trucount se validaron con fórmulas líquidas y deshidratadas de EDTA. Para este procedimiento se necesitan 100 µL de sangre entera. Siga las pautas del fabricante del tubo de recolección para el volumen mínimo de sangre que se recolectará para garantizar la dilución adecuada de la muestra; en especial cuando se determinan los recuentos absolutos con las microesferas BD Trucount.

Obtener un recuento de glóbulos blancos y un recuento diferencial de glóbulos blancos con la misma muestra de sangre entera antes de la tinción para garantizar que el recuento de glóbulos blancos esté dentro del rango lineal (consultar las Características de desempeño en la

Sección 11: Linealidad) o para calcular recuentos absolutos a partir de porcentajes.

Cuando se obtienen recuentos absolutos, la sangre anticoagulada conservada a temperatura ambiente (20°C- 25°C) se debe tincionar dentro de las 6 horas de la extracción y se debe analizar dentro de las 6 horas de tinción. Para los porcentajes, la sangre anticoagulada conservada a temperatura ambiente (20°C–25°C) se debe tincionar dentro de las 24 horas de la extracción y se debe analizar dentro de las 24 horas de tinción.

Condiciones de interferencia

No usar muestras del paciente previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre entera refrigeradas antes de la tinción pueden arrojar resultados anormales. Las muestras obtenidas de pacientes que toman inmunosupresores pueden alcanzar una resolución de baja calidad²⁴ Los blastocitos pueden interferir con los resultados de las ensayos. Las muestras hemolizadas se deben rechazar.

7. PROCEDIMIENTO

Reactivo suministrado

- BD Tritest CD3/CD19/CD45 (Número de catálogo 340381) o
- BD CD3/CD19/CD45 con tubos BD Trucount (Número de catálogo 340405)

Reactivos y materiales requeridos pero que no se suministran

- Microesferas de 3 colores BD FACS (Número de catálogo 340486)
- Solución lisante BD FACS (10X), 100 mL (Número de catálogo 349202). Consultar las IU de la solución lisante BD FACS para conocer las instrucciones de dilución y las advertencias.
- Agua de grado reactivo (destilada o desmineralizada)
- Tubos para recolección de sangre BD Vacutainer EDTA o equivalentes
- Tubos de polistireno Falcon®* descartables para ensayos, con tapa, 12 x 75 mm o equivalentes (si no se utilizan los tubos BD Trucount)
- Agitador vorticial
- Micropipeteador con puntas

- Dispensador a granel o pipeta (450 μ L) para administrar solución lisante BD FACS
- Líquido envolvente BD FACSFlow™ (número de catálogo 342003) o equivalente

CUIDADO Solo use el diluyente para solución envolvente BD FACSFlow para diluir las microesferas BD Calibrite.

- Controles BD Trucount™ (Número de catálogo 340335), necesarios si se usan los tubos BD Trucount
- Control del proceso de lisado de la sangre entera (disponible para la comercialización)

* Falcon es marca registrada de Corning Incorporated.

Tinción de las células

Los reactivos BD Tritest se pueden utilizar con o sin control de isotipos para evaluar la cantidad de anticuerpos no específicos unidos. Si quiere usar un control, está disponible el reactivo de control de isotipos BD Tritest™ IgG₁/IgG₁/CD45 (Número de catálogo 340385).

Lisar los eritrocitos luego de la tinción con la solución lisante BD FACS (1X) diluida. Proteja los tubos de la luz directa. Realizar el procedimiento a temperatura ambiente (20°C- 25°C). Consultar las Precauciones en la Sección 4, Condiciones de interferencia en la Sección 6

Pipeteo inverso

Si se utilizan los tubos BD Trucount, es fundamental agregar un volumen preciso de sangre para alcanzar el resultado. Si no se utiliza una pipeta electrónica de BD o similar que suministra un volumen preciso de sangre, aplicar la técnica de pipeteo inverso. Esta técnica aprovecha los dos toques de la pipeta.

- Para el pipeteo normal, el botón se presiona hasta el primer tope. La muestra se extrae soltando el botón. Luego se descarga presionando hasta el primer tope nuevamente.
- Para el pipeteo inverso, el botón se presiona hasta el segundo tope. Cuando se deja de apretar el botón, la muestra es absorbida por la punta. Se expulsa un volumen preciso presionando el botón hasta el primer tope. El exceso de muestra queda en la punta.

Tinción

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

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

NOTA Antes de usar, verifique que el pellet de la microesfera BD Trucount esté intacto y dentro del retenedor de metal en el fondo del tubo. Caso contrario, descartar el tubo BD Trucount y reemplazarlo por otro.

2. Cargar con la pipeta 20 μ L de BD Tritest CD3/ CD19/CD45 en el fondo del tubo

Si usa un tubo BD Trucount, descargue la pipeta por encima del retenedor de acero inoxidable. No tocar el pellet.

3. Colocar con la pipeta 50 μ L de sangre entera anticoagulada bien mezclada en el costado del tubo justo por encima del retenedor.

NOTA Evite manchar con sangre la pared del tubo. Si la sangre entera permanece en la pared del tubo, el reactivo no se tincionará.

Si usa un tubo BD Trucount, es fundamental que el procedimiento sea exacto. Usar la técnica de pipeteo inverso para descargar la muestra con la pipeta en la pared del tubo justo por encima del retenedor.

4. Tapar el tubo y agitar con cuidado para mezclar. Incubar durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20°C -25°C).
5. Agregar una vez 450 μ L de solución lisante FACS al tubo.
6. Tapar el tubo y agitar con cuidado para mezclar. Incubar durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20°C –25°C). La muestra está lista para ser analizada en el citómetro de flujo.

Citometría de flujo

Si las muestras no se analizan de inmediato luego de la tinción, consérvelas lejos de la luz a temperatura ambiente (20°C- 25°C).

Agitar bien las muestras (a baja velocidad) para reducir la compactación de las células antes de correrlas en el citómetro de flujo.²⁵ Si se usa el

cargador BD FACS Loader, agite los tubos inmediatamente antes de colocarlos en las gradillas del cargador. Realice la adquisición y análisis de los datos en modo lista con la aplicación adecuada como el software BD CellQuest Pro o BD Multiset. Antes de adquirir las muestras, ajustar el umbral para minimizar los sedimentos y garantizar que queden incluidas las poblaciones de interés.

Control de calidad

Correr una muestra de control todos los días de un individuo adulto normal o un control de sangre entera comercial para optimizar los ajustes del instrumento y como control de la calidad del sistema.²³ El uso del isotipo de control BD Tritest es optativo para activar los marcadores de fluorescencia con el fin de detectar tinción no específica.

Usar controles comerciales con valores establecidos para porcentajes positivos y recuentos absolutos en cada corrida para evaluar el desempeño del sistema.

Inspeccione visualmente CD45 en el gráfico de puntos SSC. La población de linfocitos debe aparecer como un grupo compacto y brillante con una SSC baja. Los monocitos y los granulocitos deben también aparecer como grupos o clústeres separados. No siga con el análisis si las poblaciones son difusas o si la separación entre grupos es poca o inexistente.

Consultar la Figura 1, la Figura 2 y la Figura 3 para ver datos representativos de un individuo hematológicamente normal tincionada con CD3/CD19/CD45 en un tubo BD Trucount.

Figure 1 Gráficos de puntos CD45 sin separar vs SSC (1 = linfocitos CD45+)


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

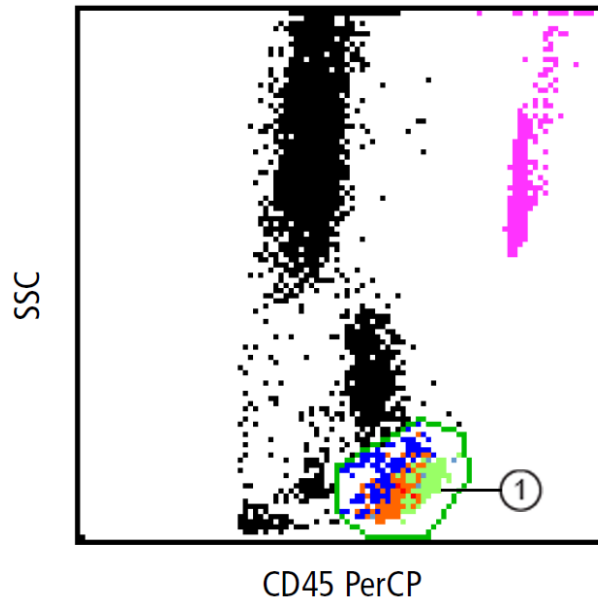


Figure 2 Gráfico de puntos CD3 vs CD 19 sin separar con microesferas BD Trucount separadas (1 = microesferas de recuento absoluto)

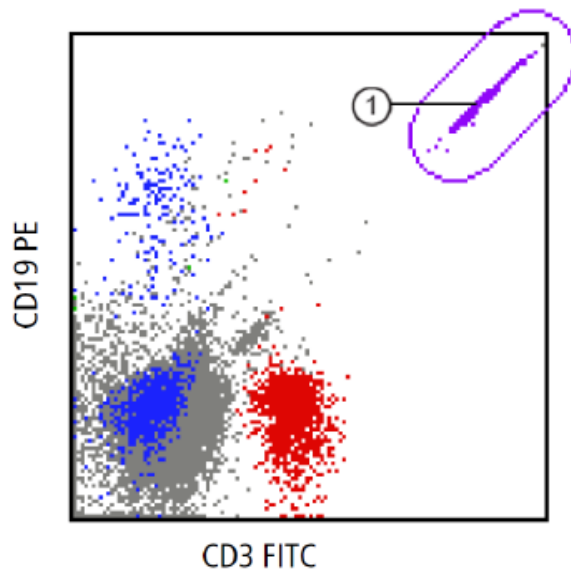
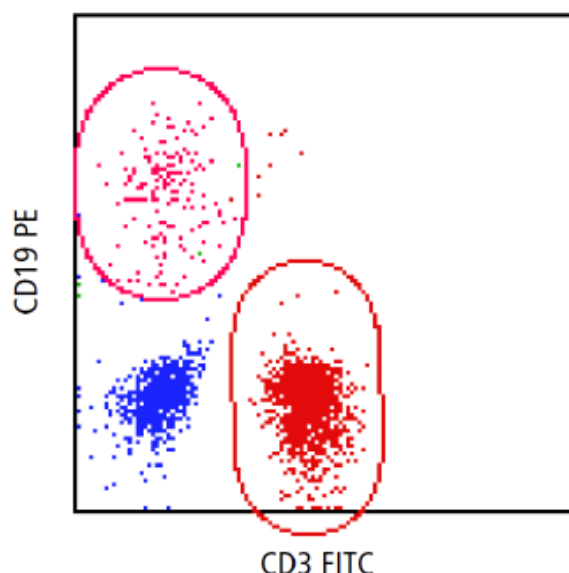


Figura 3 Gráfico de puntos CD3 con linfocitos separados vs CD19


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



8. RESULTADOS

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

Cálculo de recuentos absolutos

Durante el análisis, la cantidad absoluta (células/ μ L) de células positivas en la muestra se pueden determinar mediante la comparación de eventos con células en los eventos con microesferas. Si se utiliza el software BD Multiset, los recuentos absolutos se determinarán automáticamente. Si el análisis de datos se realiza en forma manual con el software BD CellQuest™ u otro software, dividir la cantidad de eventos celulares positivos por la cantidad de eventos con microesferas y luego multiplicar por la concentración de microesferas en los tubos BD Trucount™.

Se puede obtener el recuento absoluto de células (A) con la siguiente ecuación:

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

- X es la cantidad de eventos celulares positivos
- Y es la cantidad de eventos con microesferas
- N es la cantidad de microesferas por ensayo, que se encuentran en el envase de los BD Trucount y puede variar entre lotes
- V es el volumen de los ensayos

9. LIMITACIONES

- Los laboratorios deben establecer sus propios rangos normales de referencia para los parámetros de los reactivos BD Tritest CD3/CD19/CD45 que pueden ser afectados por el sexo y la edad del paciente y la técnica de preparación. El origen racial del paciente puede también tener un efecto,²⁶ si bien no existen suficientes datos para determinarlo. Se deben conocer la edad, el sexo, las características clínicas y el origen racial de los pacientes cuando se establece un rango de referencia.²⁷ Los rangos de referencia se suministran solo con fines informativos.
- No se validó el uso del reactivo BD Tritest CD3/CD19/CD45 con los anticoagulantes de heparina líquida o solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD) para realizar los recuentos absolutos con los tubos BD Trucount.
- El reactivo BD Tritest CD3/CD19/CD45 no ha sido diseñado para evaluar muestras para la detección de células leucémicas para uso en la fenotipificación de muestras de pacientes con leucemia.
- Los recuentos absolutos no se pueden comparar entre laboratorios que usan s equipos de fabricantes distintos.

10. VALORES PREVISTOS

Rangos de referencia

Los rangos de referencia para CD3/CD19/CD45 de la Tabla 1 se establecieron en el laboratorio de BD Biosciences en San Jose, California y en cuatro centros externos: Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH; Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD; Instituto de Medicina Tropical, Amberes, Bélgica; y la Universidad del Hospital de Carolina del Norte, Chapel Hill, Carolina del Norte.

Las edades de los individuos hematológicamente normales oscilaron entre los 18 y los 65 años de edad.


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

Tabla 1 Rangos de referencia representativos en adultos hematológicamente normales para BD Tritest CD3/CD19/CD45.

Población	n	Media	Percentil inferior a 2,5	Percentil superior a 97,5
Linfocitos B (%)	516	14	6	25
Linfocitos T totales (%)	516	72	55	84
Linfocitos B (células/ μ L) ^a	516	280	90	660
Linfocitos T totales (células/ μ L) ^a	516	1410	690	2540

a. Los valores absolutos se redondean a la concentración 10 células/ μ L.

Estos rangos de referencia están agrupados. Consultar la primera limitación para obtener más información sobre los rangos de referencia.

11. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

Se estableció el desempeño de los reactivos mediante ensayos realizados en los laboratorios de BD Biosciences en San Jose, CA, en un centro clínico externo en los Estados Unidos de América o Europa o en una combinación de centros.

Exactitud

Los porcentajes de la población de linfocitos con el reactivo BD Tritest CD3/CD19/ CD45 se comparó con los del reactivo BD Simultest™ CD3/CD19. Se compararon los recuentos absolutos con los resultados del reactivo BD Simultest y los recuentos de linfocitos obtenidos en un analizador de hematología.

Se analizaron alícuotas de la misma muestra de sangre de donantes con valores anormales y normales. El análisis de regresión de la Tabla 2 indica que los resultados son esencialmente equivalentes.

Tabla 2 Análisis de regresión

Subconjunto	n	Pendiente	Intersección	r	Rango
Linfocitos B (%)	167	0,94	1,6%-positivo	0,94	0-44
Linfocitos T totales (%)	167	0,91	5,7%-positivo	0,96	24-94
Linfocitos B (células/ μ L)	166	0,97	24 células/ μ L	0,95	0- 1.370 ^a
Linfocitos T totales (células/ μ L)	166	0,93	118 células/ μ L	0,95	130-3.710 ^a

a. Valores absolutos redondeados a la concentración 10 células/ μ L más próxima..

Reproducibilidad dentro de la muestra

Se evaluaron tres alícuotas de muestras provenientes de tres muestras que representan recuentos de CD4 altos, medios y bajos. Los resultados positivos %-fueron los siguientes (DE = desvío estándar):

- % CD19: media = 14, DE agrupada = 0,8
- % CD3: media = 66, DE agrupada = 1,1

Los resultados para recuentos absolutos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3 Reproducibilidad dentro de la muestra para el reactivo BD Tritest CD3/CD19/CD45

Subconjunto	Nivel	Media	DE	CVa (%)
Linfocitos B (células/ μ L)	Alta	1197	160	13
	Med	253	23	9
	Bajo	104	24	23
Linfocitos T totales (células/ μ L)	Alta	3.202	308	10
	Med	1.922	157	8
	Bajo	672	122	18

a. CV = coeficiente de variación

Estabilidad

Se realizó un estudio de estabilidad para evaluar el efecto del tiempo sobre las especificaciones de desempeño del reactivo BD Tritest. El estudio midió: 1) los cambios asociados con la conservación de la sangre entera antes de la tinción; 2) los cambios por el tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de datos, y 3) la combinación de los dos.

Sobre la base de los resultados de este estudio, recomendamos tincionar las muestras dentro de las 6 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 6 horas de la tinción o tincionar las muestras dentro de las 24 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 24 horas de la tinción para porcentajes.

Reactividad cruzada

CD3 y CD19 no tienen reactividad cruzada conocida en elementos formados sin linfocitos en sangre. Sin embargo, se observó que el clon CD19 acciona con las células dendríticas foliculares en centros germinales de tejido linfático mediante tinción histoquímica.²⁸

Linealidad

Se evaluó la linealidad en una concentración de glóbulos blancos de $2,5 \times 10^3$ hasta 31×10^3 glóbulos blancos/ μL y una concentración de linfocitos de $2,0 \times 10^3$ hasta $16,7 \times 10^3$ linfocitos/ μL . Se observó que los resultados fueron lineales en el rango CD19+ (52 a $2,4 \times 10^3$ células/ μL) y en el rango CD3+ (125 a $11,3 \times 10^3$ células/ μL).

GARANTÍA

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

SOLO SE GARANTIZA LA CANTIDAD Y EL CONTENIDO INDICADO EN EL RÓTULO DEL PRODUCTO AL MOMENTO DE LA ENTREGA AL CLIENTE. POR LA PRESENTE, BD DECLINA SU RESPONSABILIDAD POR TODAS LAS OTRAS GARANTÍAS, EXPRESAS O IMPLÍCITAS, QUE INCLUYEN LA GARANTÍA DE COMERCIALIZACIÓN O NO VIOLACIÓN O DE IDONEIDAD PARA UN USO DETERMINADO. LA RESPONSABILIDAD EXCLUSIVA DE BD SE LIMITA AL REEMPLAZO DE LOS PRODUCTOS O EL REEMBOLSO DEL PRECIO DE COMPRA. BD NO ES RESPONSABLE POR LOS DAÑOS A LA PROPIEDAD NI POR DAÑOS ESPECIALES O INDIRECTOS, INCLUIDAS LAS LESIONES PERSONALES O LAS PÉRDIDAS ECONÓMICAS CAUSADAS POR EL PRODUCTO.


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

REFERENCIAS

1. Schmidt RE. Anticuerpos monoclonales para diagnóstico de inmunodeficiencias. *Blut*. 1989; 59:200-206.
2. Nicholson JKA. Uso de la citometría de flujo en la evaluación y el diagnóstico de enfermedades de inmunodeficiencia primaria y secundaria. *Arch Pathol Lab Med*. 1989; 113:598-605.
3. Foucar K, Goeken JA. Aplicación clínica de las técnicas inmunológicas en el diagnóstico de trastornos linfoproliferativos y de inmunodeficiencia. *Laboratorio Médico*. 1982; 13:403-413.
4. Cohen SB, Weetman AP. Linfocitos intersticiales e intraepiteliales activados en la enfermedad autoinmune de tiroides. *Acta Endocrinol* 1988;119:161- 166.
5. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneidad de las poblaciones de células T inmunoregulatorias en el lupus eritematoso sistémico; correlación con las características clínicas. *Am J Med*. 1982; 72:783-790.
6. Nicholson JKA, Jones BM, Hubbard M. Recuentos de linfocitos T con CD4 en muestras de sangre entera con un ensayo en un tubo individual con tres colores. *Citometría*. 1993; 14:685-689.
7. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Suplemento sobre los tres colores en las pautas NIAID DAIDS para inmunotipificación en la citometría de flujo. *Citometría*. 1996; 26:227-230.
8. Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Uso de la fluorescencia CD45 y de la dispersión lateral para separar linfocitos cuando se usa el procedimiento de lisado de la sangre entera y la citometría de flujo. *Citometría*. 1996; 26: 16-21.
9. Haynes BF. Resumen de los estudios con células T realizado durante el Segundo Taller y Conferencia Internacional sobre Antígenos de Diferenciación en Leucocitos Humanos. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
10. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Las subunidades con unión no covalente de 22 y 28 kd son asimiladas rápidamente por las

- células T que reaccionan con el anticuerpo Anti- Leu-4. J Immunol. 1983; 131:536-539.
11. Knowles RW. Análisis inmunoquímico de los antígenos específicos para células T. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T. New York, NY: Springer- Verlag; 1986;1:259-288.
 12. Nadler LM. Taller sobre el panel células B/leucemia: resumen y comentarios. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos B. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:3-43.
 13. Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Familia sin linaje, LFA-1 y antígenos comunes para leucocitos; clústeres nuevos y previamente definidos. Editores: McMichael AJ, ed. Tipificación de leucocitos III: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
 14. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM y otros. Expresión citoplasmática del antígeno anti-CD3 como marcador diagnóstico para neoplasias de células T inmaduras. Sangre. 1988; 71:603-612.
 15. Brenner MB, McClean J, Dialynas DP y otros. Identificación de un segundo receptor putativo de células T. Nature. 1986; 322:145-149.
 16. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. El complejo e células T receptoras/CD3: un ensamble proteico dinámico. Annu Rev Immunol. 1988; 6:629-662.
 17. Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. Antígenos de las células B: CD19. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:34-36.
 18. Schwinzer R. Informe del clúster: CD45/CD45R. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
 19. Centros para el Control de Enfermedades. Actualización sobre las

- perspectivas en la prevención de enfermedades y promoción de la salud: precauciones universales para la prevención en la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis B y otros patógenos de la sangre en entornos sanitarios. MMWR. 1988; 37:377-388.
20. Protección del personal de laboratorio de las infecciones adquiridas en el ámbito laboral; Pautas aprobadas — Tercera edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2005. Documento CLSI M29-A3.
 21. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivación de las células H9 infectadas con VIH en preparaciones de sangre entera con reactivos de lisis/fijación en la citometría de flujo. J Immunol Methods. 1993;160:215- 218.
 22. Procedimientos para la recolección de muestras de sangre con fines diagnósticos por venopunción; Norma aprobada - Sexta edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2007. Documento CLSI GP41-A6.
 23. Enumeración de poblaciones de células definidas inmunológicamente mediante citometría de flujo; directrices aprobadas—Segunda edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2007. Documento CLSI H42-A2.
 24. Giorgi JV. Mediciones de las poblaciones de linfocitos: importancia en la medicina clínica. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL., editores Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:236- 246.
 25. Jackson AL, Warner NL. Preparación, tinción y análisis por citometría de flujo de leucocitos periféricos en la sangre.. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL., editores Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:226- 235.
 26. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influencia del origen racial en la distribución de las poblaciones de células T y de los linfocitos con Leu-11 positivo en

- donantes de sangre sanos. Inmunología diagnóstica. 1985;3(1):33-37.
27. Definición, establecimiento y verificación de los intervalos de referencia en el laboratorio clínico —Tercera edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2010. Documento CLSI EP28 - A3c.
28. Berti E, Parravicini C, Cattoretti G, Delia D, de Braud F, Cusini M. Reactividad inmunohistoquímica de anticuerpos monoclonales celulares anti-B en el timo, nódulo linfático y piel normal. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. Tipificación de leucocitos II: Linfocitos B humanos. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:313-318.



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



BD Tritest™
CD3/CD4/CD45

Para obtener los porcentajes y los recuentos absolutos de linfocitos humanos totales T y linfocitos T colaboradores en sangre entera con los eritrocitos lisados.

Ensayos	N.º de catálogo
50 ensayos	340383
50 ensayos con tubos BD Trucount	340402

11/2016

23-3027-08

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

© 2016 BD. La marca BD, el logotipo de BD y todas las otras marcas registradas pertenecen a Becton, Dickinson and Company.

Becton, Dickinson and Company

BD Biosciences

2350 Qume Drive,

San Jose, CA EE.UU. 95131 EE.UU.

Becton Dickinson Pty Ltd,

4 Research Park Drive,

Macquarie University Research Park,

North Ryde NSW 2113, Australia

Becton Dickinson Limited,

8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, Nueva Zelanda

bdbiosciences.com

ClinicalApplications@bd.com

1. USO PREVISTO

BD Tritest™ CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD4 marcado con ficoeritrina (PE)/CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores para usar con un citómetro de flujo debidamente equipado. Se usa para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos humanos T maduros (CD3+) y de linfocitos T colaboradores (CD3+CD4+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. Cuando se usa con los tubos BD Trucount™ los recuentos absolutos de estas poblaciones se pueden obtener en un tubo individual.

El reactivo BD Tritest y los tubos BD Trucount se pueden usar con el cargador BD FACS™ Loader. El reactivo se puede usar con o sin un control de isotipo.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

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

Aplicaciones clínicas

Los linfocitos T colaboradores son una subpoblación de los linfocitos T (CD3+) que son CD4+. Los recuentos de CD3+CD4+ se utilizan para caracterizar y monitorear algunas formas de inmunodeficiencia¹⁻³ y enfermedades autoinmunes.^{4,5} Obtener los porcentajes o recuentos de linfocitos T colaboradores puede ser útil en el monitoreo de individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).⁶


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

Las personas con VIH en general presentan una disminución continua en los recuentos de linfocitos T colaboradores a medida que avanza la infección

Los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) recomiendan el uso de combinaciones de reactivos con anticuerpos con CD3 y CD4 para determinar el porcentaje de linfocitos T CD4+ en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).⁸

El reactivo BD Tritest CD3/CD4/CD45 permite identificar y realizar el recuento de los linfocitos T colaboradores sin la interferencia de los monocitos CD3–CD4+.⁹⁻¹¹

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se agrega sangre entera al reactivo, los anticuerpos conjugados con el fluorocromo en el reactivo se unen específicamente a los antígenos de superficie del leucocito. Durante la adquisición, las células son impactadas por el haz de láser y la luz del láser se dispersa. Las células tincionadas producen fluorescencia. La dispersión y las señales de fluorescencia, que detecta el instrumento, brindan información sobre el tamaño de la célula, la complejidad interna y la intensidad relativa de la fluorescencia. Los reactivos de BD Tritest usan la estimulación por fluorescencia, lo que permite el gating (separación) por fluorescencia directa de la población de linfocitos,^{9- 11} para reducir la contaminación con glóbulos rojos no lisados o nucleados en el gating.

Cuando se utilizan los tubos BD Trucount, se tinciona un volumen preciso de la muestra directamente en un tubo BD Trucount. El pellet liofilizado se disuelve en el tubo, liberando una cantidad determinada de microesferas fluorescentes. Durante el análisis, se puede determinar la cantidad absoluta (células/ μ L) de células positivas en la muestra comparando los eventos con células con los eventos con microesferas. Si se utiliza el software adecuado, como BD Multiset™, los recuentos absolutos se determinarán con el software.

Si el análisis de datos se realiza en forma manual con software como BD CellQuest™, dividir simplemente la cantidad de eventos celulares

positivos por la cantidad de eventos con microesferas y luego multiplicar por la concentración de microesferas en los tubos BD Trucount™.

4. REACTIVO

Reactivo suministrado, suficiente para realizar 50 ensayos. BD Tritest CD3/CD4/CD45 se entrega en 1 mL de solución salina tamponada con albúmina de suero bovino y ázida sódica (0,1%). Contiene CD3 marcado con FITC, clon SK7;¹²⁻¹⁴ CD4 marcado con PE, clon SK3.;¹⁵⁻¹⁷ y CD45 marcado con PerCP, clon 2D1 (HLe-1).¹⁸

CD 3 identifica los linfocitos T y reconoce la cadena épsilon del complejo (TRC) del antígeno anti-CD3/receptor del antígeno de las células T.¹⁹ Este complejo está compuesto por al menos 6 proteínas cuyo peso molecular oscila entre 20 y 30 kilodaltones (kDa).²⁰ El antígeno reconocido con los anticuerpos anti-CD3 se asocia de manera no covalente con el TCR α/β o γ/δ (70 a 90 kDa).²¹

CD4 identifica a los linfocitos T colaboradores y reconoce al antígeno anti-CD4, con un peso molecular de 59 kDa,²² que interactúa con las moléculas MHC clase II y es el receptor primario para el VIH.^{23,24} La porción citoplasmática del antígeno se asocia con la proteína tirosina quinasa p56lck.²⁵

CD45 identifica leucocitos y reconoce el antígeno de los leucocitos humanos de 180- a 220-kDa que forma parte de la familia de antígenos comunes de leucocitos (LCA, por su sigla en inglés).²⁶

Los anticuerpos anti- CD3, anti-CD4 y anti-CD45 están compuestos de cadenas pesadas murinas $\gamma 1$ de y cadenas livianas kappa.

Los tubos BD Trucount contienen un pellet congelado en seco de microesferas fluorescentes en un tubo de uso único. Cada bolsa BD Trucount contiene 25 tubos, suficientes para 25 ensayos.


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

Los valores de concentración se enumeran en la siguiente tabla:

Concentración del	reactivo ($\mu\text{g/mL}$)
CD3 FITC	2,0
CD4 PE	0,2
CD45 PerCP	6,25

Precauciones

- Para uso en diagnósticos in vitro.
- No use el reactivo si observa algún cambio en el aspecto. La precipitación o la descoloración son indicio de inestabilidad o deterioro.
- El reactivo del anticuerpo contiene ázida sódica como conservante. Sin embargo, tenga cuidado de evitar la contaminación microbiana que puede arrojar resultados erróneos.

ADVERTENCIA Todas las muestras y los materiales biológicos con los que entra en contacto se consideran peligros biológicos. Manipular como si existiera la posibilidad de transmitir infecciones ^{27,28} y eliminar con las precauciones adecuadas de acuerdo con las normas federales, estatales y locales. Nunca cargar la pipeta con la boca. Use indumentaria, gafas y guantes de protección adecuados. Se informó que la fijación desactiva el VIH.²⁹

- Se debe usar la solución lisante BD FACS™ que contiene dietilenglicol y formaldehído. Consultar las instrucciones de uso (IU) de la para conocer las advertencias.
- Si se utilizan tubos BD Trucount, es fundamental agregar un volumen preciso de sangre para lograr un resultado exacto. Calibrar las pipetas para que administren exactamente 50 μL de muestra o usar la técnica de pipeteo inverso (consultar el paso 3 de la Tinción para ver una breve descripción). Consultar las instrucciones del fabricante de la pipeta para más información.
- El recuento de microesferas varía por lote de los tubos BD Trucount. Es muy importante usar el recuento de microesferas del lote de los tubos BD Trucount que está en uso cuando se ingresa este valor en el

software o cuando se calcula un recuento absoluto de forma manual. No mezclar lotes de distintos tubos en el mismo ensayo.

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

Conservación y manipulación

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

5. INSTRUMENTO

El reactivo BD Tritest CD3/CD4/CD45 y los tubos BD Trucount están diseñados para usar en un citómetro de flujo equipado con el hardware y el software de computación adecuados. Recomendamos usar los citómetros de flujo BD FACSCalibur™, BD FACSort™ o BD FACScan™. Sin embargo, los resultados se pueden obtener con otras plataformas. El citómetro de flujo debe estar equipado con equipos láser de 488 nm y ser capaz de detectar la dispersión de la luz (frontal y lateral) y la fluorescencia de tres colores con una emisión que se pueda detectar en tres rangos: 515– 545 nm, 562– 607 nm y >650 nm. El instrumento debe poder generar un umbral o discriminar con el canal de >650-nm. Con este producto, se debe utilizar el cargador BD FACS Loader.

Use microesferas BD Calibrite™ y software BD FACSComp™, versión 2.0 o posterior, para ajustar el voltaje del tubo fotomultiplicador (PMT) y la compensación de la fluorescencia y controlar la sensibilidad del instrumento antes de usarlo. Los usuarios de citómetros de flujo fabricados por otras empresas distintas a BD deben consultar las instrucciones del fabricante para calibrar la inmunotipificación con cuatro colores.

BD también desarrolló aplicaciones como el software BD Multiset que calcula automáticamente los recuentos absolutos con los tubos BD Trucount. Sin embargo, se pueden utilizar otros paquetes de software para la adquisición y el análisis de datos y los recuentos absolutos se pueden calcular manualmente.

6. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recolectar la sangre en condiciones de asepsia por venopunción^{30,31} en un tubo para recolección de sangre BD Vacutainer® EDTA. El reactivo BD Tritest CD3/CD4/CD45 y los tubos BD Trucount se validaron con fórmulas líquidas y deshidratadas de EDTA. Para este procedimiento se necesita como mínimo 100 µL de sangre entera. Siga las pautas del fabricante del tubo de recolección para el volumen mínimo de sangre que se recolectará para garantizar la dilución adecuada de la muestra, en especial cuando se realizan los recuentos absolutos con las microesferas BD Trucount.

Obtener un recuento de glóbulos blancos y un recuento diferencial de glóbulos blancos con la misma muestra de sangre antes de la tinción para garantizar que el recuento de glóbulos blancos esté dentro del rango lineal (Ver Linealidad) o calcular recuentos absolutos a partir de los porcentajes.

La sangre anticoagulada conservada a temperatura ambiente (20°C-25°C) se debe tincionar dentro de las 72 horas de la extracción y se debe analizar dentro de las 6 horas de tinción. Si las muestras se tincionan dentro de las 24 horas de la extracción, se pueden analizar dentro de las 24 horas de la tinción.

Condiciones de interferencia

No usar muestras del paciente previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre entera refrigeradas antes de la tinción pueden arrojar resultados anormales. Las muestras obtenidas de pacientes que toman inmunosupresores pueden alcanzar una resolución de baja calidad³² Los blastocitos pueden interferir con los resultados de los ensayos. Las muestras hemolizadas se deben rechazar.

7. PROCEDIMIENTO

Reactivo suministrado

- BD Tritest CD3/CD4/CD45 (Número de catálogo 340383) o
- BD CD3/CD4/CD45 con tubos BD Trucount (Número de catálogo 340402)

Reactivos y materiales requeridos pero que no se suministran

- 3 microesferas de calibración BD Calibrite (Número de catálogo 340486)
- Solución lisante BD FACS (10X), 100 mL (Número de catálogo 349202). Consultar las IU de la para conocer las instrucciones de dilución y las advertencias.
- Agua de grado reactivo (destilada o desmineralizada)
- Tubos para recolección de sangre BD Vacutainer EDTA o equivalentes
- Tubos de polistireno Falcon®* descartables para ensayos, con tapa, 12 x 75 mm o equivalentes (si no se utilizan los tubos BD Trucount)
- Agitador vorticial
- Micropipeteador con puntas
- Dispensador a granel o pipeta (450 µL) para administrar solución lisante BD FACS
- Líquido envolvente BD FACSSFlow™ (número de catálogo 342003) o equivalente

CUIDADO Solo use el diluyente para solución envolvente BD FACSSFlow para diluir las microesferas BD Calibrite.

- Controles BD Trucount™ (Número de catálogo 340335), necesarios si se usan los tubos BD Trucount
- Control del proceso de lisado de la sangre entera (disponible para la comercialización)

* Falcon es marca registrada de Corning Incorporated.

Tinción de las células

Los reactivos BD Tritest se pueden utilizar con o sin control de isotipos para evaluar la cantidad de anticuerpos no específicos unidos. Si quiere usar un control, está disponible el reactivo de control de isotipos BD Tritest $\gamma 1/ \gamma 1/CD45$ (Número de catálogo 340385).

Tinción

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

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

NOTA Antes de usar, verificar que el pellet de la microesfera BD Trucount esté intacto y dentro del retenedor de metal en el fondo del tubo. Caso contrario, descartar el tubo BD Trucount y reemplazarlo por otro. No transferir microesferas a otro tubo.

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

Si usa un tubo BD Trucount, descargue la pipeta por encima del retenedor de acero inoxidable. No tocar el pellet.

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

NOTA Evite manchar con sangre la pared del tubo. Si la sangre entera permanece en la pared del tubo, no se tincionará con el reactivo y esto puede afectar los resultados.

Es fundamental ser exacto en el manejo de la pipeta cuando se usa un tubo BD Trucount. Usar la técnica de pipeteo inverso para descargar la muestra con la pipeta en la pared del tubo justo por encima del retenedor.

Para el pipeteo inverso, presione el botón hasta el segundo tope. Cuando suelta el botón, el exceso de muestra es absorbida por la punta. Presionar el botón hasta el primer tope para expulsar un volumen exacto de la muestra; el exceso de muestra queda en la punta.

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

Citometría de flujo

Si las muestras no se analizan de inmediato luego de la tinción, consérvelas lejos de la luz a temperatura ambiente (20°C–25°C).

Agitar bien las muestras (a baja velocidad) para reducir la compactación de las células antes de correrlas en el citómetro de flujo.³³ Si se usa el cargador BD FACS Loader, agite los tubos inmediatamente antes de colocarlos en las gradillas del cargador. Obtener y analizar los datos en modo lista con el software adecuado, como el software BD CellQuest o BD Multiset. Antes de adquirir las muestras, ajustar el umbral para minimizar los sedimentos y garantizar que queden incluidas las poblaciones de interés.

Control de calidad

Correr una muestra de control todos los días de un individuo adulto normal o un control de sangre entera comercial para optimizar los ajustes del instrumento y como control de la calidad del sistema.³¹

El uso del control BD Tritest es optativo para activar los marcadores de fluorescencia con el fin de detectar tinción no específica.

Usar controles comerciales con valores establecidos para porcentajes positivos y recuentos absolutos en cada corrida para evaluar el desempeño del sistema.

Inspeccionar visualmente CD45 en comparación con el gráfico de puntos SSC La población de linfocitos debe aparecer como un grupo compacto y brillante con una SSC baja.

Los monocitos y los granulocitos deben también aparecer como grupos o clústeres separados. No siga con el análisis si las poblaciones son difusas o si la separación entre grupos es poca o inexistente.

Consultar la Figura 1, la Figura 2 y la Figura 3 para ver datos representativos de un individuo

hematológicamente normal tincionada con BD Tritest CD3/CD4/CD45 en un tubo BD Trucount.

Figure 1 Gráficos de puntos CD45 sin separar vs SSC (1 = linfocitos CD45+)

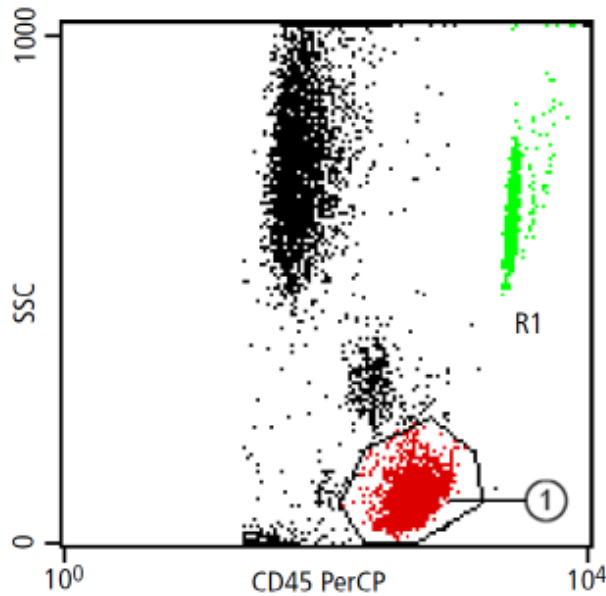


Figure 2 Gráfico de puntos CD3 vs CD4 sin separar (1= microesferas de recuentos absolutos)

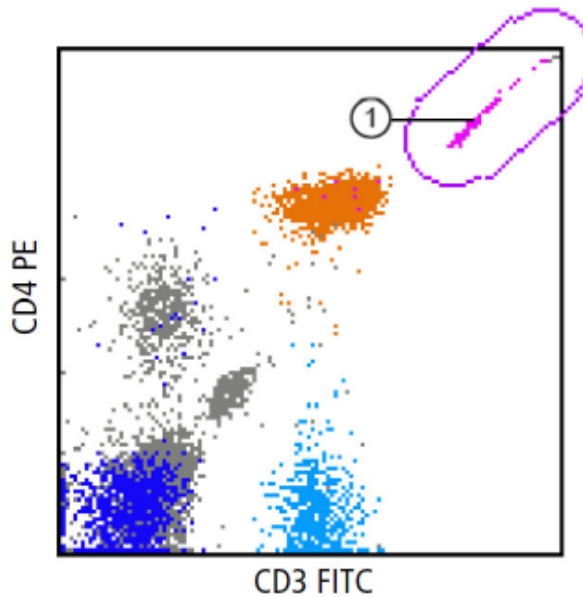
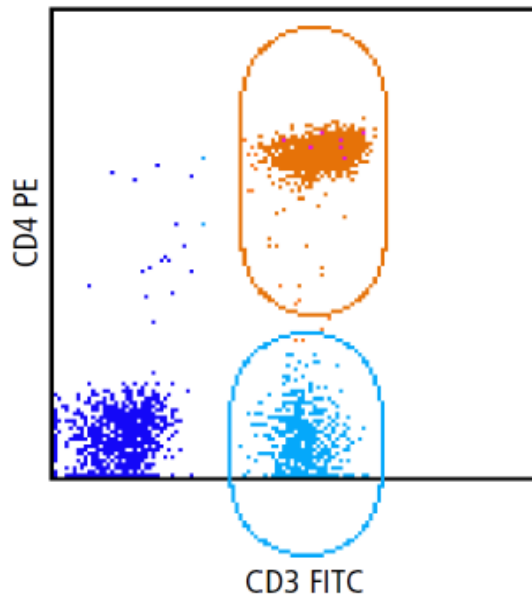


Figura 3 Gráfico de puntos CD3 con linfocitos separados vs CD4



8. RESULTADOS

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

Cálculo de recuentos absolutos

Durante el análisis, se puede determinar la cantidad absoluta (células/ μL) de células positivas en la muestra comparando los eventos con células con los eventos con microesferas. Si se utiliza el software adecuado, como BD Multiset™, los recuentos absolutos se realizarán con el software.

Si el análisis de datos se realiza en forma manual con software como BD CellQuest™, dividir simplemente la cantidad de eventos celulares positivos por la cantidad de eventos con microesferas y luego multiplicar por la concentración de microesferas en los tubos BD Trucount™.

Se puede obtener el recuento absoluto de células (A) con la siguiente ecuación:

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

- X es la cantidad de eventos celulares positivos
- Y es la cantidad de eventos con microesferas
- N es la cantidad de microesferas por ensayo, que se encuentran en el envase de los BD Trucount y puede variar entre lotes

- V es el volumen de los ensayos

9. LIMITACIONES

- Los laboratorios deben establecer sus propios rangos normales de referencia para los parámetros de los reactivos BD Tritest CD3/CD4/CD45 que pueden ser afectados por el sexo y la edad del paciente y la técnica de preparación. El origen racial del paciente³⁴ y las variaciones individuales en la expresión del epitopo³⁵ también pueden incidir, si bien no existen suficientes datos para determinarla. Se deben conocer la edad, el sexo, las características clínicas y el origen racial de los pacientes cuando se determina un intervalo de referencia determinada.³⁶ Los intervalos de referencia se suministran solo con fines informativos.
- No se validó el uso del reactivo BD Tritest CD3/CD4/CD45 con los anticoagulantes de heparina líquida o solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD) para realizar los recuentos absolutos con los tubos BD Trucount.
- El reactivo BD Tritest CD3/CD4/CD45 no ha sido diseñado para evaluar muestras para la detección de células leucémicas para uso en la fenotipificación de muestras de pacientes con leucemia.
- Los recuentos absolutos no se pueden comparar entre laboratorios que usan s equipos de fabricantes distintos.

10. VALORES PREVISTOS

Rangos de referencia

Los rangos de referencia para BD Tritest CD3/CD4/CD45 de la Tabla 1 se establecieron en el laboratorio de BD Biosciences en San Jose, California y en cuatro centros externos: Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH; Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD; Instituto de Medicina Tropical, Amberes, Bélgica; y la Universidad del Hospital de Carolina del Norte, Chapel Hill, Carolina del Norte.

Las edades de los individuos hematológicamente normales oscilaron entre los 18 y los 65 años de edad.

Estos rangos de referencia están agrupados. Consulte la primera limitación en la sección Limitaciones para obtener más información sobre los Rangos de referencia.

11. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

Se estableció el desempeño de los reactivos mediante ensayos realizados en los laboratorios de BD Biosciences en San Jose, CA, en un centro clínico externo en los Estados Unidos de América o Europa o en una combinación de centros.

Tabla 1 Rangos de referencia representativos en adultos hematológicamente normales para BD Tritest CD3/CD4/CD45.

Población	n	Media	Percentil menor a 2,5	Percentil superior a 97,5
Linfocitos T colaboradores (%)	523	45	31	60
Linfocitos T totales (%)	516	72	55	84
Linfocitos T supresores/citotóxicos (células/ μ L) ^a	523	880	410	1590
Linfocitos T totales (células/ μ L) ^a	516	1410	690	2540

a. Valores absolutos redondeados a la concentración 10 células/ μ L más próxima.

Exactitud

Los porcentajes de la población de linfocitos con el reactivo BD Tritest CD3/CD4/CD45 se comparó con los del reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 Concentración del.

Los recuentos absolutos se compararon con los resultados del instrumento BD FACSCount™.

Se analizaron alícuotas de la misma muestra de sangre de donantes con valores anormales y anormales. El análisis de regresión de la Tabla 2 indica que los resultados son esencialmente equivalentes.

Tabla 2 Análisis de regresión

Población	n	Pendiente	Intersección	r	Rango
Linfocitos T colaboradores(%)	168	0,98	0,6%-positivo	0,99	1-78
Linfocitos T totales (%)	168	0,92	5,7%-positivo	0,96	24-95
Linfocitos T colaboradores (células/ μ L)	199	1,04	1 células/ μ L	0,99	0- 1.880 ^a
Linfocitos T totales (células/ μ L)	197	1,03	-7 células/ μ L	0,99	120– 2.860 ^a

a. Valores absolutos redondeados a la concentración 10 células/ μ L más próxima.

Reproducibilidad dentro de la muestra

Se evaluaron tres alícuotas de muestras provenientes de tres muestras que representan recuentos de CD4 altos, medios y bajos. Los porcentajes positivos fueron los siguientes:

(SD = desvío estándar):

- % CD3: media = 70, DE agrupada = 0,7
- % CD4: media = 47, DE agrupada = 0,9

Los resultados para recuentos absolutos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3 Reproducibilidad dentro de la muestra para el reactivo BD Tritest CD3/CD4/CD45

Población	Nivel	Media	%CV ^a
Linfocitos T colaboradores (células/ μ L)	Alta	2.034	4,2
	Med	1.352	3,9
	Bajo	371	7,1
Linfocitos T totales (células/ μ L)	Alta	2.716	4,4
	Med	1.897	4,1
	Bajo	704	7,0

a. CV = coeficiente de variación

Estabilidad

Se realizó un estudio de estabilidad para evaluar el efecto del tiempo sobre las especificaciones de desempeño del reactivo BD Tritest. El estudio midió:

- 1) los cambios asociados con la conservación de la sangre entera antes de la tinción; 2) los cambios por el tiempo transcurrido entre la tinción y la adquisición de datos, y 3) la combinación de los dos.

Sobre la base de los resultados de este estudio, recomendamos tincionar las muestras dentro de las 72 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 6 horas de la tinción o tincionar las muestras dentro de las 24 horas de la extracción y analizarlas dentro de las 24 horas de la tinción.

Reactividad cruzada

El anticuerpo anti-CD4 reacciona con los monocitos y con los linfocitos T colaboradores¹⁷

Linealidad

Se evaluó la linealidad en una concentración de glóbulos blancos de $2,5 \times 10^3$ hasta $31,0 \times 10^3$ glóbulos blancos/ μL y una concentración de linfocitos de $2,0 \times 10^2$ hasta $16,7 \times 10^3$ linfocitos/ μL . Se observó que los resultados fueron lineales en el rango CD3+CD4+ (68 a $7,2 \times 10^3$ células/ μL) y en el rango CD3+ (123 a $1,1 \times 10^4$ células/ μL).

GARANTÍA

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

SOLO SE GARANTIZA LA CANTIDAD Y EL CONTENIDO INDICADO EN EL RÓTULO DEL PRODUCTO AL MOMENTO DE LA ENTREGA AL CLIENTE. POR LA PRESENTE, BD DECLINA SU RESPONSABILIDAD POR TODAS LAS OTRAS GARANTÍAS, EXPRESAS O IMPLÍCITAS, QUE INCLUYEN LA GARANTÍA DE COMERCIALIZACIÓN O DE IDONEIDAD PARA UN USO DETERMINADO. LA RESPONSABILIDAD EXCLUSIVA DE BD SE LIMITA AL REEMPLAZO DE LOS PRODUCTOS O EL REEMBOLSO DEL PRECIO DE COMPRA. BD NO ES RESPONSABLE POR LOS DAÑOS A LA

PROPIEDAD NI POR DAÑOS ESPECIALES O INDIRECTOS, INCLUIDAS LAS LESIONES PERSONALES O LAS PÉRDIDAS ECONÓMICAS CAUSADAS POR EL PRODUCTO.


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

REFERENCIAS

1. Schmidt RE. Anticuerpos monoclonales para diagnóstico de inmunodeficiencias. *Blut*. 1989; 59:200-206.
2. Nicholson JKA. Uso de la citometría de flujo en la evaluación y el diagnóstico de enfermedades de inmunodeficiencia primaria y secundaria. *Arch Pathol Lab Med*. 1989; 113:598-605.
3. Foucar K, Goeken JA. Aplicación clínica de las técnicas inmunológicas en el diagnóstico de trastornos linfoproliferativos y de inmunodeficiencia. *Laboratorio Médico*. 1982; 13:403-413.
4. Cohen SB, Weetman AP. Linfocitos intersticiales e intraepiteliales activados en la enfermedad autoinmune de tiroides. *Acta Endocrinol*. 1988; 119:161-166.
5. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneidad de las poblaciones de células T inmunoregulatorias en el lupus eritematoso sistémico; correlación con las características clínicas. *Am J Med*. 1982; 72:783-790.
6. Giorgi JV, Hultin LE. Alteraciones en las poblaciones de linfocitos e inmunofenotipificación por citometría de flujo en la enfermedad por VIH. *Boletín de Inmunología Clínica*. 1990;10:55-61.
7. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Aplicación de la citometría de flujo al estudio de la infección por VIH. *SIDA*. 1990; 4:479-497.
8. Centros para el Control de Enfermedades. 1997 Pautas revisadas para realizar determinaciones de las células CD4+ T en personas con virus de inmunodeficiencia humana (VIH). *MMWR*. 1997; 46:1-29.
9. Nicholson JKA, Jones BM, Hubbard M. Recuentos de linfocitos T con CD4 en muestras de sangre entera con un ensayo en un tubo individual con tres colores. *Citometría*. 1993; 14:685-689.
10. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Suplemento sobre los tres colores en las pautas NIAID DAIDS para inmunotipificación en la citometría de flujo. *Citometría*. 1996; 26:227-230.
11. Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Uso de la fluorescencia CD45 y de la dispersión lateral para separar linfocitos cuando se usa el procedimiento de lisado de la sangre entera y la citometría de flujo. *Citometría*. 1996; 26:16-21.

12. Haynes BF. Resumen de los estudios con células T realizado durante el Segundo Taller y Conferencia Internacional sobre Antígenos de Diferenciación en Leucocitos Humanos. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T. New York, NY: Springer-Verlag; 1986; 1:3-30.
13. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Las subunidades con unión no covalente de 22 y 28 kd son asimiladas rápidamente por las células T que reaccionan con el anticuerpo Anti-Leu-4. J Immunol. 1983; 131:536-539.
14. Knowles RW. Análisis inmunoquímico de los antígenos específicos para células T. Editores: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID. Tipificación de leucocitos II: Linfocitos humanos T. New York, NY: Springer-Verlag; 1986; 1:259-288.
15. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Informe conjunto del primer taller internacional sobre los antígenos de diferenciación para leucocitos humanos realizado por investigadores de los laboratorios participantes: Protocolo para T2. Editores: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF. Tipificación de leucocitos. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:25-60.
16. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD y otros. Antígenos de la membrana dependientes del timo en hombres; inhibición de linfólisis mediada por células mediante anticuerpos monoclonales para el antígeno TH2. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 1981; 78:544-548.
17. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Los anticuerpos anti-Leu-3/T4 reaccionan con los monocitos/macrófagos y las células de Langerhans. J Immunol. 1983; 131:212-216.
18. Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Familia sin linaje, LFA-1 y antígenos comunes para leucocitos; clústeres nuevos y previamente definidos. Editores: McMichael AJ, ed. Tipificación de leucocitos III: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
19. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM y otros. Expresión citoplasmática del antígeno anti-CD3 como marcador diagnóstico para neoplasias de células T inmaduras. Sangre. 1988; 71:603-612.

20. Brenner MB, McClean J, Dialynas DP y otros. Identificación de un segundo receptor putativo de células T. *Nature*. 1986; 322:145-149.
21. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. El complejo e células T receptoras/CD3: un ensamble proteico dinámico. *Annu Rev Immunol*. 1988; 6:629-662.
22. Comité Organizador del Cuarto Taller Internacional sobre Antígenos de Diferenciación de los Leucocitos Humanos. Apéndice A: Guía CD. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press Inc; 1989:1074-1093.
23. Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. El antígeno anti-CD4 (T4) es un componente esencial del receptor para el retrovirus del SIDA. *Nature*. 1984; 312:763-767.
24. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. El gen T4 codifica el receptor del virus del SIDA y está expresado en el sistema inmune y en el cerebro. *Células*. 1986; 47:333-348.
25. Rudd CE, Burgess KE, Barber EK, Schlossman SF. Anticuerpos monoclonales para las cantidades variables de precipitado de antígenos anti-CD4 y anti-CD8 de la actividad de p56lck asociada con CD4/CD8. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:326-327.
26. Schwinzer R. Informe del clúster: CD45/CD45R. Editores: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, y otros. Tipificación de leucocitos IV: Antígenos de diferenciación de los glóbulos blancos. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
27. Protección del personal de laboratorio de las infecciones adquiridas en el ámbito laboral; Pautas aprobadas — Cuarta edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2005. Documento CLSI M29-A3.
28. Centros para el Control de Enfermedades. Actualización sobre las perspectivas en la prevención de enfermedades y promoción de la salud: precauciones universales para la prevención en la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis B y





- otros patógenos de la sangre en entornos sanitarios. *MMWR*. 1988; 37:377-388.
29. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivación de las células H9 infectadas con VIH en preparaciones de sangre entera con reactivos de lisis/fijación en la citometría de flujo. *J Immunol Methods*. 1993; 160:215-218.
 30. Procedimientos para la recolección de muestras de sangre con fines diagnósticos por venopunción; Norma aprobada - Sexta edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2007. Documento CLSI GP41-A6.
 31. Enumeración de poblaciones de células definidas inmunológicamente mediante citometría de flujo; directrices aprobadas—Segunda edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2007. Documento CLSI H42-A2.
 32. Giorgi JV. Mediciones de las poblaciones de linfocitos: importancia en la medicina clínica. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL. *Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico*. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:236- 246.
 33. Jackson AL, Warner NL. Preparación, tinción y análisis por citometría de flujo de leucocitos periféricos en la sangre.. Editores: Rose NR, Friedman H, Fahey JL. *Manual de Inmunología para Laboratorio Clínico*. 3ra ed. Washington, DC: Sociedad Estadounidense de Microbiología; 1986:226- 235.
 34. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influencia del origen racial en la distribución de las poblaciones de células T y de los linfocitos con Leu-11 positivo en donantes de sangre sanos. *Inmunología diagnóstica*. 1985;03:33-37.
 35. Angadi CV. Ausencia de epítopo Leu-3a en los linfocitos colaboradores T (CD4). *J Clin Lab Anal*. 1990; 4:193-195.
 36. Definición, establecimiento y verificación de los intervalos de referencia en el laboratorio clínico —Tercera edición. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); 2010. Documento CLSI EP28 - A3c.



PROYECTO DE RÓTULOS
RÓTULO INTERNO

340298 Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP

BD Tritest™ REF 340298
CD4/CD8/CD3

Contains CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP in buffer with 0.1% sodium azide. Contiene CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP en solución tamponada con 0,1% de azida sódica.

 50  20 µL  2°C  8°C





 



Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131 USA
© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. Made in USA 23-2881-08

340300 Tritest CD3/CD16+CD56/CD45

BD Tritest™ REF 340300[†]
CD3/CD16+CD56/CD45

Contains CD3 FITC/CD16+CD56 PE/CD45 PerCP in buffer with 0.1% sodium azide. Contiene CD3 FITC/CD16+CD56 PE/CD45 PerCP en solución tamponada con 0,1% de azida sódica.

 50  20 µL  2°C  8°C





 



[†]Reorder number for this reagent with BD Trucount™ tubes is 340403.
Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, CA 95131 USA
BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2014 BD Made in USA 23-2879-04

340344 Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP

BD Tritest™ REF 340344[†]
CD3/CD8/CD45

Contains CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP in buffer with 0.1% sodium azide. Contiene CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP en solución tamponada con 0,1% de azida sódica.

 50  20 µL  2°C  8°C

[†]Reorder number for this reagent with BD Trucount™ tubes is 340406.
Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, CA 95131 USA
BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2014 BD Made in USA 23-2918-05


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

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



340381 Tritest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP

BD Tritest™ CD3/CD19/CD45		Cat. No. 340381
Contains CD3 FITC, CD19 PE*, and CD45 PerCP* with BSA and 0,1% azide. Store at 2° to 8°C. For In Vitro Diagnostic Use.	Contient CD3 FITC, CD19 PE et CD45 PerCP avec de la BSA et 0,1% d'azide. A conserver entre 2° et 8°C. Pour diagnostic in vitro.	Contiene CD3 FITC, CD19 PE y CD45 PerCP con BSA y 0,1% de Azida. Conservar de 2° a 8°C. Uso exclusivo diagnóstico in vitro.
CD3/CD19/CD45		
*Patents—PE: US 4,520,110,859,582; 5,055,556; Europe 76,695; Canada 1,179,942; PerCP: US 4,876,190 BD Biosciences, San Jose, CA 95131 USA; B-9320 Erembodegem Belgium		
日本ベクトン・ディッキンソン株式会社		23-3289-02
BD Biosciences		R22,32 An 523,36,60
BD is a trademark of Becton, Dickinson and Company. © 2006 BD. Made in USA.		50 Test, 20 µl/Test
Exp: Verw. bis:		Lot: Ch-B:

340383 Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP

BD Tritest™		REF 340383[†]
CD3/CD4/CD45		
Contains CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP in buffer with 0,1% sodium azide.	Contiene CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP en solución tamponada con 0,1% de azida sódica.	
†Reorder number for this reagent with BD Trucount™ tubes is 340402.		
Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, CA 95131 USA		Made in USA
© 2016 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.		23-3290-06
BD		LOT

Establecimiento importador:

Becton Dickinson Argentina SRL

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

Teléfono: 0800-444-5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Establecimiento elaborador:

Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences

2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131

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

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



y/o

Becton Dickinson Caribe, L TD

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

Directora Técnica: Nora Silvina Lucero, Farmacéutica MN N° 15.549

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

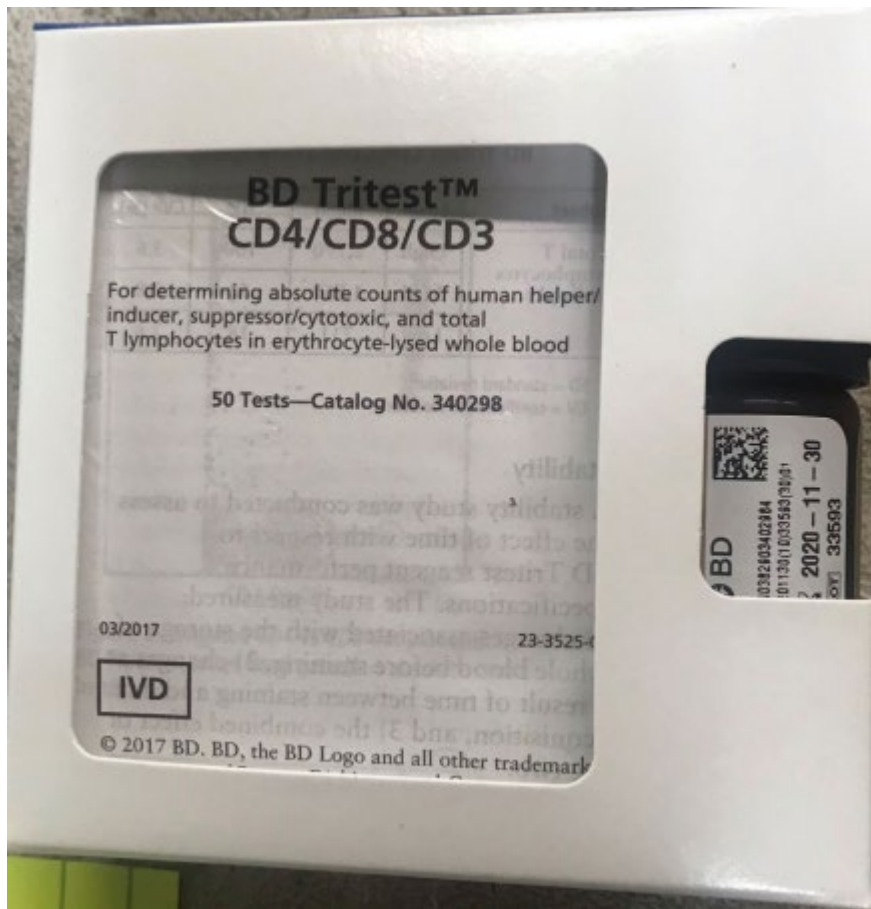
Autorizado por la ANMAT. PM-634-601



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

PROYECTO DE RÓTULOS
RÓTULO EXTERNO

340298 Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP

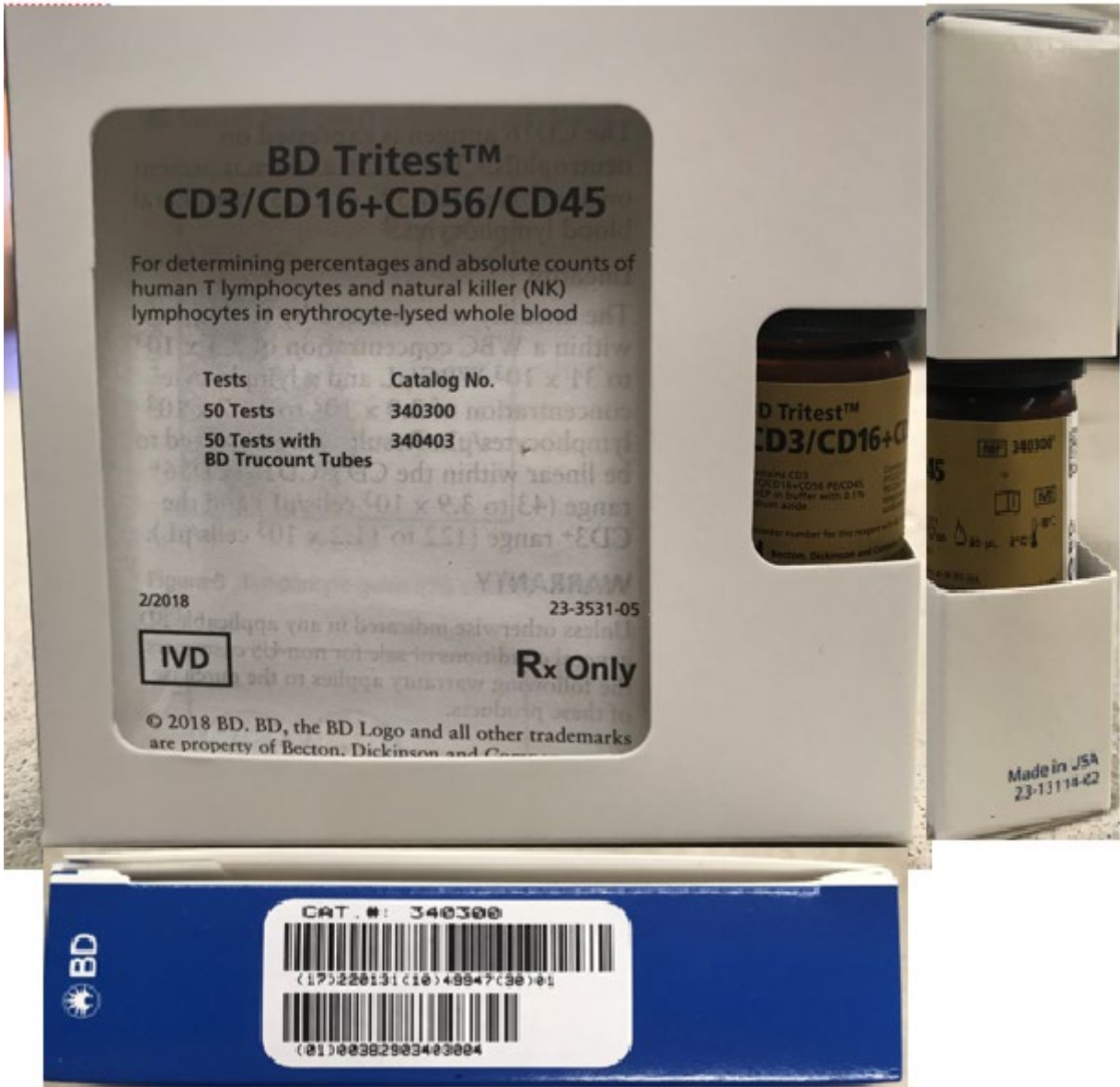



Karina Valeria Traverso
Co-Directora Técnica / Apoderada
M.N. 14.733 - M.P. 20.293
Becton Dickinson Argentina SRL

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



340300 Tritest CD3/CD16+CD56/CD45



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

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



340344 Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP



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

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

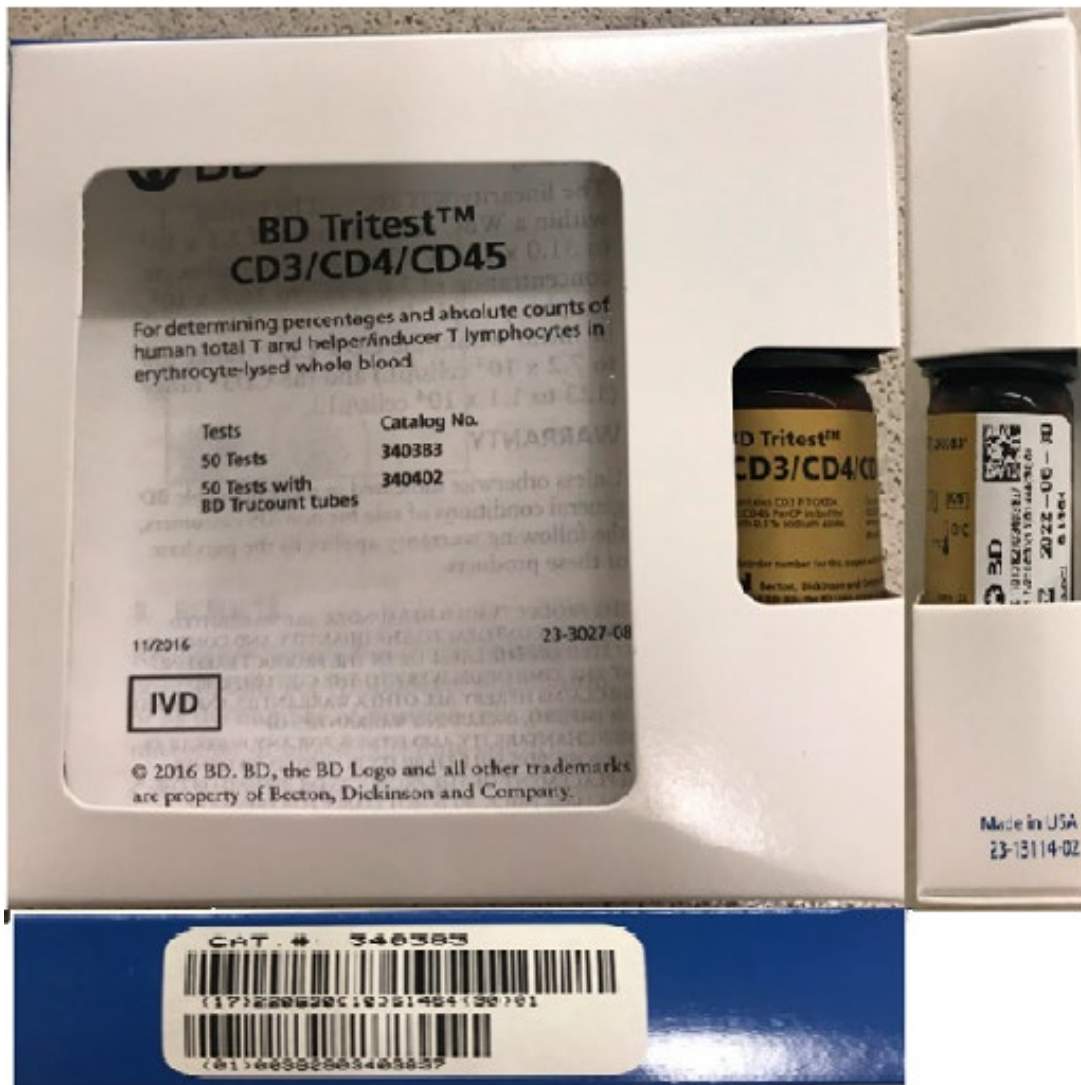


340381 Tritest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP



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

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



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

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



Establecimiento importador:

Becton Dickinson Argentina SRL

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

Teléfono: 0800-444-5523

E-mail: crc_argentina@bd.com

Establecimiento elaborador:

Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences
2350 QUME DR. - San Jose, CA, ESTADOS UNIDOS 95131

Becton Dickinson Caribe, L TD
Vicks Drive, Lot 1 Comer Road 735 - Cayey, PR, ESTADOS UNIDOS 00736

Directora Técnica: Nora Silvina Lucero, Farmacéutica MN N° 15.549

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

Autorizado por la ANMAT. PM-634-601


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



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Hoja Adicional de Firmas
Informe gráfico

Número:

Referencia: Rótulos e Ifus EX-2021-82634979- -APN-DGA#ANMAT

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 120 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2022.06.29 09:49:40 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.06.29 09:49:41 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: EX-2021-82634979-APN-DGA#ANMAT

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN

PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

Nº EX-2021-82634979-APN-DGA#ANMAT

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

NOMBRE COMERCIAL: 340298 Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP, 340300 Tritest CD3/CD16+CD56/CD45, 340344 Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP, 340381 Tritest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP y 340383 Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP.

INDICACION DE USO: BD Tritest: La familia de reactivos de diagnóstico in vitro BD Tritest™ son reactivos para inmunofluorescencia directa de tres colores para su uso con un citómetro de flujo debidamente equipado, para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos humanos T maduros (CD3+), de las siguientes subpoblaciones de linfocitos T, en sangre entera con los eritrocitos lisados: • Linfocitos T colaboradores (CD3+CD4+) • Linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3+CD8+) • Linfocito natural killer (NK) (CD3-CD16+CD56+) • Linfocitos B (CD19+) Todos estos reactivos cuando se usan con los tubos BD Trucount™ los recuentos absolutos de estas poblaciones se pueden obtener en un tubo individual. El reactivo BD Tritest y los tubos BD Trucount se pueden usar con el cargador BD FACS™ Loader. El reactivo se puede usar con o sin un control de isotipo. BD Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP BD Tritest™ CD4 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD8 marcado con ficoeritrina (PE)/CD3 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores. Se utiliza con tubos BD

Trucount™ para identificar y obtener recuentos absolutos en células/μL de linfocitos humanos T (CD3+), linfocitos T colaboradores (CD3+CD4+) y linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3+CD8+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. BD Tritest CD3/CD16+CD56/CD45 BD Tritest™ CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD16+CD56 marcados con ficoeritrina (PE)/CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores para usar con un citómetro de flujo debidamente equipado. Se usa para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos humanos T maduros (CD3+) y linfocitos natural killer (NK) (CD3–CD16+CD56+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. BD Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP BD Tritest™ CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD8 marcados con ficoeritrina (PE)/CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores para usar con un citómetro de flujo debidamente equipado. Se usa para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de los linfocitos humanos T maduros (CD3+) y de linfocitos T/ supresores/citotóxicos (CD3+CD8+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. BD Tritest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP BD Tritest™ CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD19 marcado con ficoeritrina (PE)/CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores para usar con un citómetro de flujo debidamente equipado. Se usa para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de las de linfocitos humanos T maduros (CD3+) y de linfocitos B (CD19+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. BD Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP BD Tritest™ CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD4 marcado con ficoeritrina (PE)/CD45 marcado con proteína clorofila peridina (PerCP) es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores para usar con un citómetro de flujo debidamente equipado. Se usa para identificar y obtener porcentajes y recuentos absolutos de las poblaciones de linfocitos humanos T maduros (CD3+) y de linfocitos T colaboradores (CD3+CD4+) en sangre entera con los eritrocitos lisados.

FORMA DE PRESENTACIÓN: BD Tritest™ contiene: 340298 Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP: 50 ensayos 340300 Tritest CD3/CD16+CD56/CD45: 50 ensayos y 50 ensayos con tubos BD Trucount™ 340344 Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP: 50 ensayos por frasco y 50 ensayos por frasco con tubos BD Trucount™ 340381 Tritest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP: 50 ensayos y 50 ensayos con tubos BD Trucount™ 340383 Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP: 50 ensayos y 50 ensayos con tubos BD Trucount™.

PERÍODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE PRESENTACIÓN: 340298 Tritest CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP: 24 meses 340300 Tritest CD3/CD16+CD56/CD45: 23 meses 340344 Tritest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP:13 meses 340381 Tritest CD3 FITC/CD19 PE/CD45 PerCP:16 meses 340383 Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP: 15 meses Almacenamiento: 2°C - 8 °C. No congelar ni exponer a la luz directa.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: para los códigos 340298 340300 340344 340381 340383: 1- Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences 2350 QUME DR., San José, CA Estados Unidos 95131. 2- Becton Dickinson Caribe, LTD Vicks Drive, Lot 1 Corner Road 735 Cayey, PR Estados Unidos 00736.

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

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del **PRODUCTO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PM-634-601**

Nº EX-2021-82634979-APN-DGA#ANMAT

AM

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2022.10.15 23:04:55 -03:00

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2022.10.15 23:04:57 -03:00