

USO PROPUESTO

LYMPHOGRAM® es un reactivo para inmunofluorescencia directa de tres colores de uso en citometría de flujo diseñado para la determinación en sangre periférica, médula ósea y otros fluidos corporales de las principales subpoblaciones de linfocitos entre las que se incluyen los linfocitos T totales (CD3+), los linfocitos B totales (CD19+), las células agresoras naturales (NK del inglés natural killer) (CD3-CD56+), y las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+) y citotóxicos (CD3+CD8+).

GENERALIDADES

La Citometría de Flujo (CF) es una herramienta importante en la caracterización analítica y cuantitativa de células por su capacidad de ofrecer información simultánea, rápida y cuantitativa de varios parámetros de cada una de las células que constituyen la muestra a analizar. La citometría de flujo requiere suspensiones celulares que se incuban con anticuerpos marcados de forma fluorescente y que están dirigidos contra proteínas celulares específicas. El citómetro de flujo detecta las señales de fluorescencia del complejo antígeno-anticuerpo marcado con el fluorocromo, de forma que la intensidad de fluorescencia de las células marcadas es proporcional a la cantidad de sitios antigénicos presentes en la célula.

Los linfocitos humanos pueden clasificarse en tres poblaciones principales según su función biológica y su expresión de antígenos de superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y células NK. Los linfocitos T (CD3+), cuyos precursores surgen de la médula ósea y después migran y maduran en el timo, se subdividen además en poblaciones funcionalmente distintas, siendo las mejor definidas las células T cooperadoras (CD3+CD4+) y las células T citotóxicas (CD3+CD8+). Las células T no producen anticuerpos y son los mediadores de la inmunidad celular. Los linfocitos B son los productores de anticuerpos y los mediadores de la respuesta humoral particularmente efectiva contra toxinas, bacterias enteras y virus libres. Las células NK (CD3-CD56+) median la citotoxicidad contra ciertas células tumorales y células infectadas por virus. La citotoxicidad mediada por células NK no requiere que las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I o clase II estén presentes sobre la célula diana.

LYMPHOGRAM® reconoce los antígenos presentes en las distintas subpoblaciones de linfocitos CD3, CD19, CD56, CD4 y CD8, y por tanto puede utilizarse en los estudios de caracterización inmunofenotípica de linfocitos. Estos estudios se utilizan habitualmente en la monitorización del estado inmunológico de pacientes después de un trasplante y en la caracterización y el seguimiento de inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes, leucemias etc⁽¹⁻³⁾.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La citometría de flujo (CF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas, generalmente células, alineadas de una en una por delante de un haz de luz láser. La interacción de las células con el rayo de luz genera señales de dos tipos: la generada por la dispersión de la luz (FSC/SSC) y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula. Estas señales se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que se procesan en el ordenador.

Cuando se añade el reactivo a la muestra, los anticuerpos marcados con fluorocromos presentes en el reactivo se unen de forma específica a los antígenos frente a los que están dirigidos, permitiendo la detección por CF de las distintas subpoblaciones linfocitarias.

La población de eritrocitos, que podría dificultar la detección de la población de interés, se elimina usando una solución lisante de hemáties previa a la adquisición de la muestra en el citómetro. Se recomienda la utilización de la solución lisante de eritrocitos Quicklysis™ (CYT-QL-1) que no requiere lavados posteriores ni contiene fijador y por tanto minimiza la manipulación de la muestra y evita la pérdida celular asociada al proceso de centrifugación^(4, 5).

El recuento de las subpoblaciones linfocitarias generalmente se expresa como número de células marcadas por microlitro (recuento absoluto) o como porcentaje de células marcadas respecto al total de linfocitos o leucocitos presentes en la muestra que a su vez puede determinarse por CF en base a su característico patrón de FSC/SSC (tamaño/granularidad o complejidad interna). Cada laboratorio debe fijar el procedimiento operativo más adecuado, adaptado a las características propias del modelo de citómetro a utilizar.

COMPOSICIÓN DEL REACTIVO

LYMPHOGRAM® se suministra en PBS con azida sódica al 0,1%. El reactivo contiene la siguiente mezcla de anticuerpos:

- Anticuerpo monoclonal CD8 marcado con isocianato de fluoresceína (FITC), clon: UCH-T4, isotipo: IgG2a
- Anticuerpo monoclonal CD19 marcado con el isocianato de fluoresceína (FITC), clon: HD37, isotipo: IgG1
- Anticuerpo monoclonal CD3 marcado con R-ficoeritrina (PE), clon: 33-2-A3, isotipo: IgG2a
- Anticuerpo monoclonal CD56 marcado con R-ficoeritrina (PE), clon: C5.9, isotipo: IgG2b
- Anticuerpo monoclonal CD4 marcado con el tandem R-ficoeritrina-cianina 5 (PECy5), clon: 13B8.2, isotipo: IgG1

Purificación: cromatografía de afinidad

Cantidad suministrada por vial: 0,125ml (50 determinaciones si se usan 25 µl de reactivo por 10⁶ células)

El reactivo no es considerado estéril.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El reactivo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a una temperatura de 2-8°C. El reactivo no se debe congelar ni exponer a luz directa durante el almacenamiento o la incubación con las células. Mantener el vial seco. Una vez abierto, el vial debe ser almacenado en posición vertical para evitar posibles derrames.

ADVERTENCIAS Y RECOMENDACIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro.
2. Este producto se presenta listo para su utilización. Si se altera mediante dilución o adición de otros componentes, queda invalidado para su utilización en diagnóstico in vitro.
3. El reactivo es estable durante el periodo de tiempo indicado en la fecha de caducidad cuando se almacena apropiadamente. No debe utilizarse después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto. Si se almacena en condiciones diferentes a las especificadas, tales condiciones deben ser validadas por el usuario.
4. Alteraciones en la apariencia del producto, como la presencia de precipitados o cambios de color son indicativos de inestabilidad o deterioro. En esas condiciones el reactivo no debe ser utilizado.
5. Contiene 0.1% de azida de sodio (CAS-Nr. 26628-22-8) como conservante, pero aún así se debe tener cuidado para evitar la contaminación bacteriana del reactivo puesto que en esas circunstancias podrían obtenerse resultados incorrectos.
 - La azida de sodio pura es tóxica si se ingiere (R22), en caso de ingestión, acudir inmediatamente al médico y mostrar esta información (S46).

- Se debe usar ropa protectora adecuada (S36).
 - Al entrar en contacto con ácidos libera un gas tóxico (R32).
 - Los compuestos de azida deben desecharse con grandes cantidades de agua para evitar la formación de acumulaciones en cañerías de metal donde podrían darse las condiciones para una explosión.
6. Todas las muestras biológicas y los materiales con los que estén en contacto deben considerarse como riesgos biológicos. Se recomienda su manipulación como sustancias capaces de transmitir infecciones ⁽⁶⁾ y desecharse con las precauciones reglamentarias establecidas para este tipo de productos. Se recomienda su manipulación con ropa y guantes protectores apropiados y su uso por personal suficientemente cualificado para las técnicas descritas. Evitar el contacto de las muestras con la piel y las membranas mucosas, en caso de contacto lavar inmediatamente con abundante agua.
7. La utilización del reactivo usando tiempos de incubación o temperaturas diferentes a las recomendadas pueden provocar resultados erróneos. Cualquiera de estos cambios deben ser validados por el usuario.

PROCEDIMIENTO

Material suministrado

LYMPHOGRAM[®] suficiente para 50 determinaciones si se usan 25µl de reactivo por 10⁶ células

Material requerido pero no suministrado

- Citómetro de Flujo equipado con láser de ion argón de 488 nm y el ordenador y software asociado.
- Tubos de ensayo adecuados para la adquisición de las muestras en el citómetro de flujo utilizado. Habitualmente se utilizan tubos con fondo redondo de 6 mL, 12x 75 mm.
- Pipeta automática (100µL) y puntas.
- Micropipeta con puntas.
- Cronómetro
- Agitador Vortex
- Control isotópico negativo
- Solución lisante Quicklysis[™]
- Tampón fosfato (PBS) con azida sódica al 0,1%.
- Perfect-Count Microspheres[™] (CYT-PCM-50) para el cálculo de recuentos absolutos.

Preparación

El protocolo para procesar las muestras con LYMPHOGRAM[®] depende de la muestra a estudiar:

- Las muestras de sangre deben obtenerse de forma aséptica por punción venosa ^(7, 8) en un tubo estéril de recolección de sangre que contenga un anticoagulante apropiado (se recomienda el uso de EDTA). El análisis requiere cien (100) µl de muestra de sangre entera por tubo, asumiendo un rango normal de 4-10 x 10³ leucocitos por µl. Para muestras con recuento de leucocitos muy alto se recomienda diluir las muestras con PBS hasta obtener una concentración óptima aproximada de 1x10⁴ células/µl. Almacenar las muestras sanguíneas entre 18-22°C hasta su procesamiento. Se recomienda procesar las muestras de sangre dentro de las 24 horas siguientes a su extracción. No deben utilizarse muestras hemolizadas o con agregados celulares en suspensión.
- Las muestras de médula ósea deben pasarse 3 ó 4 veces a través de una jeringa para deshacer los agregados celulares. Realizar un recuento de los leucocitos presentes en la muestra y diluirla con PBS para obtener una concentración aproximada de 1x 10⁴ células/µl.
- No es necesario diluir las muestras con recuentos de linfocitos bajos, como aspirados de aguja fina (PAAF) o líquido cefalorraquídeo.

Se recomienda seguir el siguiente protocolo de preparación de la muestra:

1. Mezclar 100µl de la muestra de sangre periférica o médula ósea con 25µl de LYMPHOGRAM[®]. En el caso de trabajar con otros fluidos corporales con pocas células como PAAF, líquido cefalorraquídeo, lavados broncoalveolares etc, mezclar 200µl de la muestra con 25µl de LYMPHOGRAM[®].
Para evaluar la unión inespecífica del anticuerpo puede prepararse un tubo control isotópico.
2. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
3. Añadir 2 ml de solución lisante de hematíes Quicklysis^{™*} e incubar la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
4. Adquirir directamente en el citómetro de flujo dentro de las cuatro primeras horas de finalizar la preparación de la muestra. Si las muestras no se analizan inmediatamente después de la preparación, se deben almacenar en oscuridad a 2-8°C. La calibración del instrumento debe hacerse según las recomendaciones del fabricante del citómetro. Antes de adquirir las muestras, ajustar las condiciones de adquisición para minimizar el debris y asegurarse de que la población celular de interés se distingue apropiadamente. Es recomendable agitar suavemente el tubo antes de adquirir la muestra en el citómetro para reducir la agregación celular.

*Nota: El empleo de otras soluciones de lisis diferentes puede requerir la eliminación de los hematíes lisados. En ese caso se debe seguir el protocolo recomendado por el fabricante de la solución de lisis empleada

Si se usa Perfect-Count Microspheres[™] para el cálculo de los recuentos absolutos, se debe mezclar el vial de Perfect-Count Microspheres[™] manualmente durante 30-40 segundos, inmediatamente antes de añadirse a la muestra. Usando la técnica del pipeteo reverso, añadir el mismo volumen de Perfect-Count Microspheres[™] que de muestra (100µl si la muestra es sangre periférica o médula ósea y 200µl si es otro líquido corporal con recuento de linfocitos bajo).

Análisis por CF

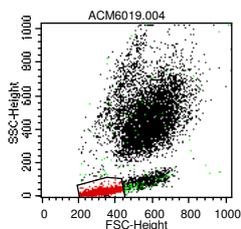
Verificar que el citómetro está alineado correctamente y estandarizado para dispersión de luz (FSC/SSC en escala lineal) e intensidad de fluorescencia (FL1, FL2, FL3 y FL4 en escala logarítmica), y que se ha fijado la compensación de color adecuada siguiendo las instrucciones del fabricante del citómetro.

En el análisis de los ficheros LYMPHOGRAM[®] puede resultar complicado definir las ventanas y regiones de análisis, puesto que coexisten distintas poblaciones celulares en la misma fluorescencia. CYTOGNOS recomienda el uso del software de análisis inteligente CYTORAMA-LYMPHOGRAM[®] que analiza los ficheros adquiridos de forma automática, identificando las distintas subpoblaciones e informando sobre los resultados cuantitativos. El programa, compatible con plataformas Apple y Windows, genera un informe de los resultados que puede imprimirse y exportarse a bases de datos. Para información sobre las ventajas de este software de análisis inteligente, contactar con CYTOGNOS o su distribuidor autorizado.

El análisis manual de los ficheros LYMPHOGRAM[®] puede realizarse siguiendo las indicaciones que se detallan a continuación. Las gráficas de resultados que se incluyen corresponden a una muestra de sangre periférica de un individuo sano marcada con LYMPHOGRAM[®].

1. Figura nº 1: FSC frente a SSC, sin ventana de adquisición (no gate). Dibujar una región (R1 o A) para seleccionar la zona linfocítica de acuerdo a su característico bajo patrón de FSC/SSC. Esta región incluirá todos los linfocitos y algunos eventos contaminantes.

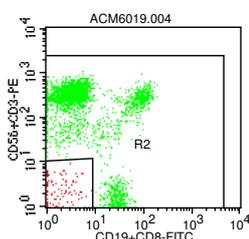
1. Gate: No gate



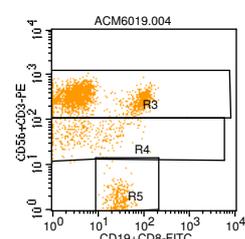
Gate Statistics			
File: ACM6019.004	Log Data Units: Linear Values		
Patient ID:	Tube: Untitled		
Acquisition Date: 18-Aug-05	Gate: No Gate		
Gated Events: 10000	Total Events: 10000		
X Parameter: FSC-Height (Linear)	Y Parameter: SSC-Height (Linear)		
Gate	Events	% Gated	% Total
G1	3103	31.03	31.03
G2	3209	32.09	32.09
G3	2055	20.55	20.55
G4	384	3.84	3.84
G5	748	7.48	7.48
G6	2988	29.88	29.88
T-LYMPHOCYTES	2006	20.06	20.06
NK CELLS	303	3.03	3.03
B-LYMPHOCYTES	679	6.79	6.79

- Figura nº 2: FL1 (CD19-FITC + CD8-FITC) frente a FL2 (CD3-PE + CD56-PE), mostrar sólo los eventos de la zona linfoide (G1) definida como los eventos incluidos en la región R1 o A. Trazar una región (R2 o B) que excluya los eventos que no expresan los marcadores contenidos en FL1 y FL2.
- Figura nº 3: FL1 (CD19-FITC + CD8-FITC) frente a FL2 (CD3-PE + CD56-PE), mostrar sólo la población de linfocitos totales (G6) definida como los eventos incluidos en la región R1 y R2 (R1 AND R2) o AB. Trazar una región (R3 o C) que incluya la población de linfocitos T (CD3+), una región (R4 o D) que incluya la población de NK (CD56+CD3-), y una región (R5 o E) que incluya la población de linfocitos B (CD19+). Tomando como base estas regiones previamente definidas podemos definir la subpoblación de linfocitos T totales como los eventos incluidos en R1 AND R2 AND R3 ó ABC, la subpoblación de células NK totales como los eventos incluidos en R1 AND R2 AND R4 ó ABD, y la subpoblación de linfocitos B como los eventos incluidos en R1 AND R2 AND R5 ó ABE.

2. Gate: G1 = R1



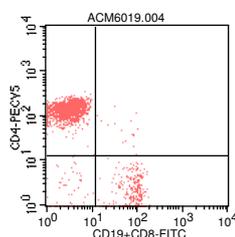
3. Gate: G6 = R1 AND R2



Region Statistics						
File: ACM6019.004	Log Data Units: Linear Values					
Patient ID:	Tube: Untitled					
Acquisition Date: 18-Aug-05	Gate: G6					
Gated Events: 2988	Total Events: 10000					
X Parameter: CD19+CD8-FITC (Log)	Y Parameter: CD56+CD3-PE (Log)					
Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean	
R1	2988	100.00	29.88	22.55	243.64	
R2	2988	100.00	29.88	22.55	243.64	
R3	2006	67.14	20.06	21.58	354.16	
R4	303	10.14	3.03	11.69	55.19	
R5	679	22.72	6.79	30.25	1.51	

- Figura nº 4: FL1 (CD19-FITC + CD8-FITC) frente a FL3 (CD4-PECy5), mostrar sólo la población de linfocitos T definida como los eventos incluidos en las regiones R1 R2 y R3 (R1 AND R2 AND R3) o ABC. Fijar la región de cuadrantes para identificar las distintas subpoblaciones de linfocitos T: CD3+CD4+CD8- (en la zona superior-izquierda: UL), CD3+CD4+CD8+ (en la zona superior-derecha: UR), CD3+CD4-CD8- (en la zona inferior-izquierda: LL), CD3+CD4-CD8+ (en la zona inferior-derecha: LR).

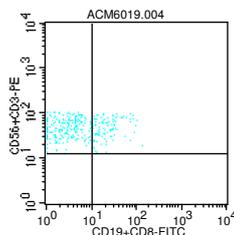
4. Gate: T LYMPHOCYTES = R1 AND R2 AND R3



Quadrant Statistics						
File: ACM6019.004	Log Data Units: Linear Values					
Patient ID:	Tube: Untitled					
Acquisition Date: 18-Aug-05	Gate: T-LYMPHOCYTES					
Gated Events: 2006	Total Events: 10000					
X Parameter: CD19+CD8-FITC (Log)	Y Parameter: CD4-PECy5 (Log)					
Quad Location: 12, 13						
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean	
UL	1505	75.02	15.05	3.45	148.93	
UR	16	0.80	0.16	58.04	62.45	
LL	55	2.74	0.55	3.57	2.79	
LR	430	21.44	4.30	85.98	2.16	

- Figura nº 5: FL1 (CD19-FITC + CD8-FITC) frente a FL2 (CD3-PE + CD56-PE), mostrar sólo la población de células NK definida como los eventos incluidos en las regiones R1 R2 y R4 (R1 AND R2 AND R4) o ABD. Fijar la región de cuadrantes para identificar las distintas subpoblaciones de células NK: CD3-CD56+CD8- (en la zona superior-izquierda: UL) y CD3-CD56+CD8+ (en la zona superior-derecha: UR).

5. Gate: NK CELLS = R1 AND R2 AND R4



Quadrant Statistics						
File: ACM6019.004	Log Data Units: Linear Values					
Patient ID:	Tube: Untitled					
Acquisition Date: 18-Aug-05	Gate: NK CELLS					
Gated Events: 303	Total Events: 10000					
X Parameter: CD19+CD8-FITC (Log)	Y Parameter: CD56+CD3-PE (Log)					
Quad Location: 10, 12						
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean	
UL	202	66.67	2.02	3.41	54.78	
UR	101	33.33	1.01	28.27	56.03	
LL	0	0.00	0.00	***	***	
LR	0	0.00	0.00	***	***	

RESULTADOS

El recuento de las distintas subpoblaciones de linfocitos puede expresarse como el porcentaje de las células marcadas respecto al total de linfocitos o leucocitos presentes en la muestra. El cálculo del porcentaje de linfocitos totales debe hacerse como los eventos incluidos en la región R1 y R2 (G6 = R1 AND R2) ó AB para evitar los eventos contaminantes que se incluyen en la zona linfoide. El recuento de las subpoblaciones linfocitarias también puede expresarse como el número de células marcadas por microlitro (recuento absoluto). El recuento absoluto de cada una de las subpoblaciones linfocitarias puede calcularse por dos métodos:

- El recuento absoluto por plataforma doble combina los resultados obtenidos en un contador hematológico y en el citómetro de flujo y se realiza siguiendo la siguiente fórmula:
Recuento absoluto (células/μl) = Recuento de leucocitos (valor de células/μl del hemograma) x % de linfocitos x % de la subpoblación celular de interés ÷ 10⁴.
- El recuento absoluto por plataforma única es el método más recomendable en base a los resultados obtenidos por distintos laboratorios y estudios de calidad externa puesto que se reduce la variabilidad intra e inter laboratorio^(9, 10). La metodología basada en microesferas de referencia consiste en que cantidades conocidas de microesferas fluorescentes se mezclan con un volumen conocido de muestra, que ha sido lisada sin lavados, de forma que las esferas se adhieren junto con las células. CYTOGNOS recomienda el uso de las esferas de referencia Perfect-Count Microspheres™ (CYT-PCM-50) para el recuento absoluto de las subpoblaciones linfocitarias, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento absoluto (Cells/}\mu\text{l)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células de la subpoblación de interés}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de esferas Perfect-Count}^{\text{TM}} \text{ adquiridas}} \times \text{N}^{\circ} \text{ de Perfect-Count Microspheres /}\mu\text{l} \text{ (valor facilitado en la ficha técnica del reactivo)}$$

LIMITACIONES

- Las muestras de sangre deben almacenarse a 18-22°C y procesarse dentro de las 24 horas siguientes a su recolección.
- Es recomendable adquirir en el citómetro las muestras teñidas lo antes posible para optimizar los resultados, en caso contrario podrían marcarse de forma inespecífica células no viables. La exposición prolongada a reactivos líticos puede producir la degradación de los leucocitos y la pérdida de células de la población de interés.
- La presencia de glóbulos rojos nucleados y concentraciones anormales de proteína o hemoglobinopatías pueden dar lugar a la lisis incompleta de eritrocitos. Estas condiciones pueden dar lugar a recuentos celulares falsamente bajos puesto que los eritrocitos no lisados pueden ser contados como linfocitos.
- Los resultados obtenidos por CF pueden ser erróneos si el láser del citómetro no está perfectamente alineado o las ventanas de análisis están colocadas de forma incorrecta.
- Cada laboratorio debe establecer su propio rango de normalidad de las subpoblaciones linfocitarias en base a la técnica de preparación de la muestra utilizada. Los datos del rendimiento del reactivo han sido obtenidos con muestras de sangre entera recogidas con EDTA como anticoagulante. El rendimiento del reactivo puede verse afectado por el uso de otros anticoagulantes.
- Las muestras de algunos pacientes pueden resultar difíciles de analizar si existen alteraciones o números muy bajos de la población celular a estudio.
- Las muestras celulares resultantes de la separación por gradiente de densidad pueden no tener la misma concentración relativa que la muestra de origen. Las diferencias pueden ser relativamente insignificantes en muestras de individuos con recuentos sanguíneos normales. En pacientes leucopénicos, la pérdida selectiva de subpoblaciones específicas pueden afectar a la exactitud de la determinación.
- Es importante comprender el patrón normal de expresión de este antígeno y su relación con la expresión de otros antígenos relevantes con el fin de realizar un análisis adecuado⁽¹¹⁻¹⁴⁾.
- Los estados patológicos no siempre se detectan por porcentajes anormales de ciertas poblaciones de leucocitos. Un individuo con una patología puede presentar los mismos porcentajes de leucocitos que un individuo sano. Por esta razón, es recomendable utilizar los resultados del ensayo en combinación con otros datos clínicos y de diagnóstico.

VALORES ESPERADOS

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos normales de referencia para los recuentos de las subpoblaciones linfocitarias puesto que dichos valores pueden estar influenciados por la edad, el sexo y la raza⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Los rangos de normalidad obtenidos en CYTOGNOS se muestran en la siguiente tabla con carácter meramente informativo. Los resultados se expresan como porcentaje de las distintas subpoblaciones linfocitarias respecto al total de linfocitos. Estos resultados se obtuvieron utilizando el programa de análisis CYTORAMA-LYMPHOGRAM® y corresponden a muestras de sangre periférica de adultos sanos con edades comprendidas entre los 18 y 60 años.

SUBPOBLACIÓN LINFOCITARIA	MEDIA	VALOR MÁXIMO	VALOR MÍNIMO
% de linfocitos T totales (CD3+)	76.6	88.68	50.87
% de linfocitos T CD4+CD8-	48.1	67.11	24.43
% de linfocitos T CD4-CD8++	23.7	53.64	12.16
% de linfocitos T CD4-CD8+	4.0	7.48	1.42
% de linfocitos T CD4+CD8+	0.9	6.02	0.14
% de linfocitos B totales (CD19+)	13.0	25.5	4.98
% de células NK totales (CD56+CD3-)	9.7	24.4	2.07

CONTROL DE CALIDAD

- Para obtener resultados óptimos se recomienda verificar la precisión de las pipetas y que el citómetro está correctamente calibrado.
- Los fluorocromos isocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) y ficoeritrina-cianina 5 (PECy5) emiten a distintas longitudes de onda pero tienen cierto solapamiento espectral que debe corregirse mediante compensación electrónica si se emplean combinaciones de distintos AcMo conjugados con estos fluorocromos. Los niveles óptimos de compensación pueden establecerse mediante el análisis en un diagrama de puntos de células de individuos normales teñidas con AcMo mutuamente excluyentes conjugados con los fluorocromos a utilizar en el ensayo.
- Para evaluar la unión inespecífica del anticuerpo puede prepararse un tubo de control isotópico.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Reproducibilidad:

Se evaluaron 10 medidas repetidas de tres muestras de sangre periférica con recuentos de linfocitos altos, medios y bajos. En la siguiente tabla se muestra el porcentaje medio de las distintas subpoblaciones linfocitarias respecto al total de linfocitos, la desviación estándar y el coeficiente de variación obtenido para cada uno de los tres niveles estudiados:

Nivel de linfocitos	% de linfocitos T totales (CD3+)	% de linfocitos T CD4+CD8-	% de linfocitos T CD4-CD8+	% de linfocitos B totales (CD19+)	% de células NK totales (CD56+CD3-)
Alto	83.39 ± 0.49 (CV=0.59)	43.19 ± 0.73 (CV=1.69)	30.32 ± 1.05 (CV=3.46)	11.53 ± 0.43 (CV=3.73)	5.08 ± 0.24 (CV=4.72)
Medio	81.10 ± 0.42 (CV=0.52)	48.00 ± 0.52 (CV=1.08)	30.37 ± 0.88 (CV=2.90)	14.42 ± 0.31 (CV=2.15)	4.48 ± 0.42 (CV=9.38)
Bajo	86.53 ± 0.59 (CV=0.68)	58.72 ± 0.88 (CV=1.50)	24.91 ± 0.59 (CV=2.37)	1.72 ± 0.17 (CV=9.88)	11.72 ± 0.54 (CV=4.61)

Especificidad:

El antígeno CD3 se encuentra en la superficie celular de timocitos maduros y linfocitos T en sangre periférica.

El antígeno CD4 se encuentra en una subpoblación de linfocitos T de sangre periférica, en algunos timocitos y en células patológicas de origen T. Los monocitos y macrófagos muestran expresión débil de CD4. Los linfocitos B y granulocitos normales no expresan el antígeno CD4 en su superficie.

El antígeno CD8 se encuentra en una subpoblación de linfocitos T de sangre periférica, en el 60% de los timocitos y en células patológicas de origen T. Los linfocitos B normales, monocitos y granulocitos no expresan el antígeno CD8 en superficie.

El antígeno CD19 se encuentra en la superficie celular de las células B normales y neoplásicas, está ausente en las células T, monocitos y granulocitos.

El antígeno CD56 se encuentra en las células NK y en subpoblaciones de linfocitos T CD3+CD4+ y CD3+CD8+. Los linfocitos B normales, monocitos y granulocitos no expresan el antígeno CD56 en su superficie.

Para evaluar la reactividad cruzada se realizó un estudio de los anticuerpos que componen el reactivo LYMPHOGRAM®: CD3, CD4, CD8, CD19, y CD56, en muestras de sangre periférica de individuos sanos. Los resultados demostraron que los anticuerpos se unen específicamente a la población de linfocitos apropiada.

Exactitud

Se compararon los porcentajes de las principales subpoblaciones linfocitarias obtenidos con LYMPHOGRAM® y los obtenidos con las combinaciones de anticuerpos CD3-FITC/CD4-PE/CD8-PECy5 y CD45-FITC/CD56-PE/CD19-PECy5/CD3-APC. Los resultados del análisis de regresión obtenido se muestran en la siguiente tabla donde se comprueba que la reactividad obtenida por ambos métodos es sustancialmente equivalente en muestras de sangre periférica.

	% de linfocitos T totales (CD3+)	% de linfocitos T CD4+CD8-	% de linfocitos T CD4-CD8+	% de linfocitos B totales (CD19+)	% de células NK totales (CD56+CD3-)
R ²	0.98	0.99	0.99	0.99	0.90
Pendiente	0.95	10.95	1.10	1.00	0.82
Intersección	2.91	5.19	-0.96	0.61	1.05
Rango	63.8 – 87.5	24.8 – 61.5	11.5 – 46.4	4.4 – 22.8	4.6 – 12.23
CCI	0.99	0.99	0.99	0.99	0.97

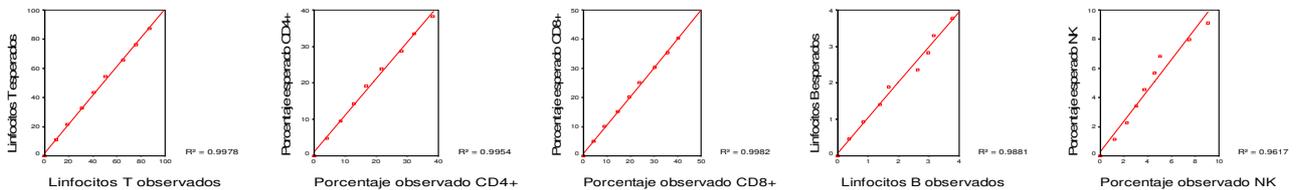
Repetitividad

Se estudiaron 10 muestras distintas marcadas con 2 lotes diferentes LYMPHOGRAM®. Cada par de datos para una misma muestra se analizó obteniendo la intensidad de fluorescencia media (IMF), la desviación estándar y el coeficiente de variación agrupado. Los resultados del análisis se muestran en la siguiente tabla:

	% de linfocitos T totales (CD3+)	% de linfocitos T CD4+CD8-	% de linfocitos T CD4-CD8+	% de linfocitos B totales (CD19+)	% de células NK totales (CD56+CD3-)
Media	75.92	44.45	25.82	11.76	11.22
DS agrupada	2.35	2.07	1.19	1.23	0.99
CV (%) agrupado	3.10	4.66	4.61	10.46	8.82

Linealidad:

Se realizaron diluciones de una muestra de sangre periférica para comprobar la escala de concentración de las células marcadas obtenidas. Los resultados muestran un nivel de correlación apropiado de los resultados obtenidos con los esperados en base a la dilución efectuada.



BIBLIOGRAFÍA

- Orfao A, González de Buitrago JM La citometría de flujo en el laboratorio clínico. Sociedad española de bioquímica clínica y patología Molecular 1995.
- Stetler-Stevenson M. Flow cytometry analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. Semin Hematol 2001 Apr;38(2):111-23.
- Okuno SH, Tefferi A, Hanson C, Katzmann JA, Li CY, Witzig TE. Spectrum of diseases associated with increased proportions or absolute numbers of peripheral blood natural killer cells. BrJ Haematol. 93: 810-812 (1996)
- Menéndez P, et al. Comparison between a lyse-and-then-wash method and a lyse-non-wash technique for the enumeration of CD34+ hematopoietic progenitor cells. Cytometry (Comm. Clin. Cytometry) 34: 264-271 (1998)
- Gratama JW, Menéndez P, Kraan J, Orfao A. Loss of CD34+ hematopoietic progenitor cells due to washing can be reduced by the use of fixative-free erythrocyte lysing reagents. J Immunol. Methods 239: 13-23 (2000)
- Protection of Laboratory Workers from occupationally acquired infections. Second edition; approved guideline (2001). Villanova PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document M29-A2.
- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture- approved standard; Fifth edition (2003). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H3-A5.
- Clinical applications of flow cytometry: Quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline (1998). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H42-A.
- Mandy F, Brando B. Enumeration of absolute cell counts using immunophenotypic techniques. Current Protocols in Cytometry 6.8.1-6.8.26 (2000)
- Brando B, et al. Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cells in blood. For the European Working Party on Clinical Cell Analysis (EWGCCA). Cytometry 42: 327-346 (2000)
- Bellido M, Rubiol E, Übeda J, Estivill C, López O, Manteiga R, Nomdedéu JF. Rapid and simple immunophenotypic characterization of lymphocytes using a new test. Haematologica 83: 681-685 (1998)
- Giustolisis GM, Gruszka-Westwood AM, Morilla RM, Matutes E. Lymphogram: a rapid flow cytometry method for screening patients with lymphocytosis. Haematologica 86: 1223-1224 (2001)
- Ruiz-Arguelles A, Pérez-Romano B. Immunophenotypic analysis of peripheral blood lymphocytes. Current Protocols in Cytometry 6.5.1-6.5.14 (2000)

14. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematology neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry* 46: 23-7 (2001)
15. Reichert et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol* 60:190-208 (1991)
16. Prince HK et al. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu-11 positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol*. 3: 33-39 (1985)
17. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. *Am J Clin Pathol* 100:111-5 (1993)

GARANTÍA

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

EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS

	Fecha de caducidad (generalmente AAAA-MM)
	Límite de temperatura
	Consulte las instrucciones de uso
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Código de catálogo
	Fabricante

FABRICADO POR

CYTOGNOS SL

Polígono La Serna, Nave 9
37900 Santa Marta de Tormes

Salamanca (España)

Tel: + 34-923-125067

Fax: + 34-923-125128

Información sobre pedidos: admin@cytognos.com

Información técnica: support@cytognos.com

www.cytognos.com

103480ESP

Última revisión: 08/01/2007