



# PERFECT-COUNT Microesferas™

REF: CYT-PCM-100

Para uso diagnóstico in vitro

100 determinaciones



Solo para uso profesional



Cytognos, S.L.  
Pol. La Serna, Km. 0, Nave 9  
37900 Santa Marta de Tormes  
Salamanca  
Tel.: + 34 923 12 50 67  
Fax: + 34 923 12 51 28  
[admin@cytognos.com](mailto:admin@cytognos.com)  
[support@cytognos.com](mailto:support@cytognos.com)

[www.cytognos.com](http://www.cytognos.com)

	Utilizar antes de
	Limitación de conservación
	Ver Instrucciones antes de usar
	Reactivo para diagnóstico in vitro
	Código de lote
	Código de producto
	Fabricado por

## 1. USO PROPUESTO

Perfect-Count Microesferas™ está diseñado para la determinación del recuento absoluto de poblaciones celulares por citometría de flujo en muestras de sangre, médula ósea, aféresis y cultivos celulares.

Perfect-Count Microesferas™ es un sistema de microesferas fluorescentes de referencia que puede utilizarse de forma conjunta con anticuerpos monoclonales (AcMo) conjugados con distintos fluorocromos que permitan la identificación de las subpoblaciones celulares de las que se pretenda realizar el recuento absoluto.

## 2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

En los últimos años, el recuento del número absoluto de células está adquiriendo una importancia cada vez mayor tanto en la investigación biomédica como en el laboratorio de diagnóstico clínico. La enumeración de los niveles absolutos de células o de subpoblaciones celulares concretas en muestras clínicas es una técnica ya establecida por ejemplo en la enumeración de linfocitos T CD4+ y CD8+ de sangre periférica especialmente para la monitorización de pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH+), en el recuento de células progenitoras y precursores hematopoyéticos CD34+ en pacientes candidatos a autotransplantes y en el recuento de leucocitos residuales en las bolsas para transfusiones (1-3).

El recuento absoluto de subpoblaciones celulares por citometría de flujo puede realizarse usando una técnica de plataforma doble en la que se combina la información proporcionada por el citómetro de flujo (CF) y un contador hematológico, o una técnica de plataforma única en la que se emplea sólo el citómetro de flujo. La plataforma única está siendo el método más empleado en el recuento absoluto de células, puesto que evita las infravaloraciones y la variabilidad interlaboratorio al identificar positivamente las células de interés y excluir las células contaminantes que podrían llevar a errores (1). El volumen de muestra analizado puede determinarse por métodos volumétricos o métodos basados en cantidades conocidas de microesferas fluorescentes que sirven de referencia, si bien los métodos basados en el empleo de partículas de referencia pueden aplicarse a cualquier citómetro de flujo independientemente del fabricante del mismo (2).

## 3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los procedimientos que se describen en este folleto se refieren a aplicaciones de clasificación inmunofenotípica en los que se combina el uso de Perfect-Count Microesferas™ con AcMo que permitan la identificación de las poblaciones celulares de las que se pretenda realizar el recuento absoluto.

Perfect-Count Microesferas™ es un sistema de plataforma única basado en microesferas fluorescentes que contiene un control interno de calidad para asegurar la precisión de los resultados obtenidos. El control de calidad se basa en la presencia de dos tipos de esferas (definidas como esferas tipo A y tipo B) seleccionadas por su densidad superior e inferior a la densidad de las células sanguíneas. Variaciones en la proporción entre los dos tipos de esferas avisan al usuario de problemas durante la preparación de la muestra y/o la adquisición por parte del citómetro que invalidarían el resultado final. Este sistema puede ser utilizado como doble estándar de referencia que permite por una parte asegurar la eficacia del ensayo y por otra el cálculo del número de células de la población de interés por  $\mu\text{L}$ .

- En la ficha técnica que acompaña este producto se especifica la proporción de microesferas tipo A y tipo B presentes en el vial y el rango que se considera aceptable para esta proporción. Una vez adquirida la muestra en el citómetro de flujo, el usuario debe comprobar que la proporción entre las dos subpoblaciones de partículas de referencia de densidades distintas (A y B) coincidan o entran dentro del rango aceptable de variabilidad con la proporción existente en la mezcla de origen. De esta forma, se verifica que la distribución de las partículas de referencia en el vial es homogénea y que la adquisición de células y microesferas se ha realizado de forma no selectiva.
- En la ficha técnica que acompaña este producto se especifica el número de microesferas totales por microlitro. El cálculo del número absoluto de la población celular de interés presente en la muestra, se realiza en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento absoluto (Céls/}\mu\text{l)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células contadas de la población de interés}}{\text{N}^\circ \text{ Total de microesferas contadas (R1}\cdot\text{R2)}} \times \text{N}^\circ \text{ de Perfect-Count/}\mu\text{l} \text{ (valor facilitado por el fabricante)}$$

#### **4. REACTIVO**

Perfect-Count Microesferas™ contiene una mezcla con dos tipos de microesferas (esferas tipo A y tipo B) seleccionadas por sus diferentes características de flotación, de dispersión de luz y de fluorescencia. Ambos tipos de microesferas permanecen estables a lo largo del tiempo y se detectan fácilmente en las distintas fluorescencias del citómetro de flujo si bien presentan intensidades distintas para su correcta diferenciación.

- Las microesferas tipo A son esferas fluorescentes de 6,4  $\mu\text{m}$  excitables a 506 nm. En el citómetro de flujo presentan bajo FSC y SSC, emiten fluorescencia en FL1, FL2 y FL3 pero son negativas para FL4.
- Las microesferas tipo B son esferas fluorescentes de 6,36  $\mu\text{m}$  excitables a longitudes de onda de entre 365-650 nm. En el citómetro de flujo presentan bajo FSC y SSC, emiten fluorescencia en FL1, FL2, FL3 y FL4 pero la intensidad en FL1, FL2 y FL3 es superior a la emitida por las esferas A.
- Perfect-Count Microesferas™ contiene suplementos proteínicos en suspensión para prevenir la adhesión de las microesferas a las paredes de los tubos.

#### **5. 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. Los reactivos son estables durante el periodo de tiempo indicado en la fecha de caducidad cuando son almacenados apropiadamente. No utilizar el reactivo después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto. Si el producto es almacenado en condiciones diferentes a las recomendadas, el usuario debe validar estas condiciones.
4. Alteraciones en la apariencia del producto, como la presencia de precipitados o decoloración son indicativos de inestabilidad o deterioro. En esas condiciones el reactivo no debe ser utilizado.
5. El reactivo contiene azida de sodio (CAS-Nº: 26628-22-8) como conservante, pero aún así se debe tener cuidado para evitar la contaminación bacteriana del reactivo.
  - La azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) 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 muy 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 que estén en contacto deben considerarse como riesgos biológicos. Se recomienda su manipulación como capaces de transmitir infecciones (4) 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. En caso de contacto accidental de las muestras con la piel, lavar con abundante agua.
7. La precisión en el pipeteo es el principal factor de variabilidad por lo que se debe utilizar la técnica del pipeteo reverso para dispensar la muestra y las microesferas de referencia. Dicha técnica consiste en presionar el dispensador de la pipeta hasta el segundo tope, aspirar, y a continuación, sin tocar las paredes del tubo con la punta de la pipeta, dispensar la muestra aspirada sobre el final del tubo, presionando suavemente el dispensador hasta el primer tope. De esta forma queda en la punta de la pipeta un pequeño exceso de muestra que es recomendable desechar. Es importante dispensar la muestra en el fondo del tubo y no sobre la pared del mismo.
8. No se recomienda utilizar la primera muestra que se aspira para dispensar (es decir, dispensar con la punta seca). Para realizar este paso de una forma aún más precisa se recomienda humedecer la punta aspirando la muestra dos o tres veces desde el segundo tope para finalmente dispensar sólo hasta el primer tope sobre el final del tubo.
9. Se recomienda verificar el correcto funcionamiento de la pipeta automática a utilizar en la preparación de las muestras para la obtención de resultados óptimos. La pipeta puede calibrarse con agua destilada (1  $\mu\text{l}$  = 1 mg) y una balanza de precisión de la forma siguiente:
  - Colocar un recipiente de pesada en una balanza de laboratorio
  - Poner la balanza a cero
  - Aspirar y dispensar 100 $\mu\text{L}$  de agua destilada sobre el recipiente de pesada.
  - Anotar el peso obtenido
  - Repetir el proceso hasta haber realizado un mínimo de 10 pesadas

- Calcular la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las pesadas (%CV)
  - El funcionamiento de la pipeta se considerará correcto si el %CV es menor de 2,0%.
10. Los recuentos de microesferas pueden variar según el lote. Se debe utilizar siempre el recuento de microesferas totales y los márgenes de aceptabilidad entre la proporción de esferas tipo A y tipo B del lote de reactivo que se está utilizando.
  11. Para la obtención de resultados correctos, evitar la evaporación o derrames del vial de Perfect-Count Microesferas™ y de las muestras.
  12. No deben de usarse métodos de preparación de la muestra que requieran lavados porque puede producirse una pérdida desconocida de células, que llevaría a resultados erróneos en el recuento absoluto. En este sentido se recomienda la utilización de la solución lisante de eritrocitos QUICKLYSIS™ (CYT-QL-1) que no requiere lavados posteriores ni contiene fijador (5, 6).
  13. Las muestras teñidas y lisadas deben adquirirse en el citómetro de flujo inmediatamente después de la adición de Perfect-Count Microesferas™.
  14. La sensibilidad del método depende del número de eventos adquiridos, para obtener un valor preciso de recuento absoluto se recomienda detener la adquisición cuando en la región de microesferas totales se hayan adquirido de 1.000 a 20.000 eventos (1).
  15. El uso del reactivo con tiempos de incubación o temperaturas diferentes a las recomendadas podrían causar resultados erróneos. Estos cambios deben ser validados por el usuario.

## **6. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO:**

Almacenar entre 2-8 °C. NO CONGELAR.

Este producto es fotosensible y debe ser protegido de la luz durante su almacenamiento e incubación con células.

Una vez abierto, Perfect-Count Microesferas™ debe almacenarse en posición vertical para evitar posibles derrames.

## **7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:**

La obtención de sangre se debe hacer en forma aséptica por punción venosa (7) en un tubo estéril de recolección de sangre que contenga un anticoagulante apropiado (se recomienda el uso de EDTA). Las muestras de aféresis deben obtenerse de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Almacenar las muestras sanguíneas entre 20-25 °C hasta su procesamiento. Se recomienda procesar las muestras de sangre dentro de las 24 horas siguientes a su extracción y las aféresis dentro de las 6 horas siguientes a su obtención.

No deben de utilizarse muestras criopreservadas ni muestras hemolizadas o con agregados celulares.

Realizar un recuento de los leucocitos (WBC) presentes en la muestra. Con los anticuerpos monoclonales de CYTOGNOS, se obtienen resultados óptimos cuando los recuentos de leucocitos son 4-10 x 10<sup>6</sup> células/mL.

- Los recuentos de leucocitos mayores a 10 x 10<sup>6</sup> células/mL deben diluirse con plasma antólogo o PBS hasta obtener una concentración celular dentro del rango 4-10 x 10<sup>6</sup> células/mL. Es importante tener en cuenta el factor de dilución empleado para realizar el cálculo de los recuentos absolutos.
- No es posible concentrar las muestras con recuentos inferiores a 4 x 10<sup>6</sup> células/mL puesto que el Perfect-Count Microesferas™ es un método cuantitativo directo de recuento absoluto.

## **8. PROCEDIMIENTO**

### **8.1. Material suministrado**

Perfect-Count Microesferas™, Ref: CYT-PCM-100 contiene reactivo suficiente para 100 determinaciones

### **8.2. Material necesario pero no suministrado**

- Citómetro de Flujo: las Perfect-Count Microesferas™ están diseñadas para su utilización en citómetros de flujo equipados con láser de ion argón de 488 nm para la excitación fluorescente y el ordenador y software asociado.
- Combinación de AcMo conjugados con fluorocromo que permitan la identificación de las subpoblaciones celulares de las que se pretenda realizar el recuento absoluto por citometría de flujo.
- Solución lisante de eritrocitos que no requiera lavados posteriores (se recomienda el uso del reactivo QUICKLYSIS™)(5,6)
- Tubos de ensayo de 6 mL, 12x 75 mm para la adquisición en el citómetro de flujo.
- Pipeta automática (100 µL) y puntas
- Cronómetro
- Agitador Vortex
- Parafilm

### **8.3. Preparación de las muestras**

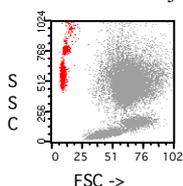
1. Verificar la precisión de la pipeta. Su calibración se puede realizar utilizando agua destilada (1 µl agua destilada = 1 mg) y una balanza de precisión. En el punto 5.9 del apartado de Advertencias y Recomendaciones de este manual se describe detalladamente el procedimiento de verificación de la técnica de aspiración.
2. Homogeneizar la muestra manualmente (no Vortex).
3. Pipetear con la técnica de pipeteo reverse 100 µL de muestra en cada tubo de ensayo. Los puntos 7 y 8 del apartado de Advertencias y Recomendaciones de este manual hacen referencia a la técnica de pipeteo reverse.

- Realizar el marcaje celular añadiendo los anticuerpos monoclonales de interés siguiendo las indicaciones del fabricante. Mezclar suavemente en el Vortex e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Añadir 2 ml de solución de lisis QUICKLYSIS™ a cada tubo. Mezclar y mantener en oscuridad durante 10 minutos y a temperatura ambiente.
- Inmediatamente antes de utilizar Perfect-Count Microesferas™, homogeneizar manualmente el vial durante 30-40 segundos (no utilizar Vortex). Con la misma pipeta que se ha dispensado la muestra, añadir 100µL (mismo volumen que previamente habíamos añadido de muestra) de Perfect-Count Microesferas™ a cada tubo utilizando también la técnica de pipeteo reverso.
- Tapar la muestra con Parafilm y volver a homogeneizar durante unos segundos antes de adquirirla en el citómetro de flujo.

#### 8.4. Análisis por Citometría de Flujo

##### A. Preparación del citómetro

Verificar que el citómetro está alineado correctamente y estandarizado para dispersión de la luz (los parámetros FSC y SSC en escala lineal) e intensidad de fluorescencia (los parámetros FL1, FL2, FL3, FL4 en escala logarítmica) y que se ha fijado la compensación de color adecuada siguiendo las instrucciones del fabricante del citómetro. Antes de adquirir las muestras, fijar un valor para el umbral (threshold o discriminator) en el parámetro FSC que permita reducir al mínimo los restos celulares pero que incluya las poblaciones de interés. La población de Perfect-Count Microesferas™ aparece de color rojo en la figura siguiente:



##### B. Adquisición de los datos

Agitar manualmente los tubos durante 10 segundos inmediatamente antes de su adquisición para asegurar la mezcla homogénea de células y microesferas.

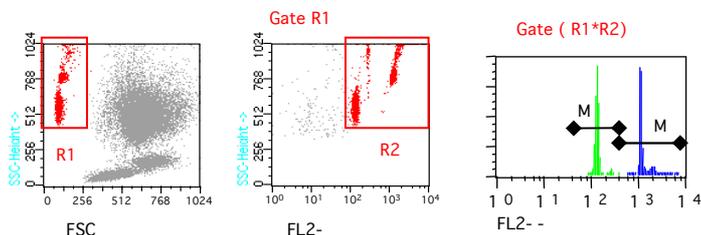
Adquirir y almacenar todos los eventos. La sensibilidad del método depende del número de eventos adquiridos, para obtener un valor preciso de recuento absoluto se recomienda detener la adquisición cuando en la región de microesferas totales se hayan adquirido de 1.000 a 20.000 eventos (1).

Se recomienda adquirir la muestra a velocidad baja o media para evitar la formación de agregados celulares.

##### C. Análisis de los resultados

En la plantilla de análisis de los resultados se utilizarán los diagramas apropiados para la discriminación de la población celular de interés en cada estudio y las siguientes figuras adicionales para el análisis de los resultados obtenidos con las Perfect-Count Microesferas™:

- Un diagrama FSC/SSC donde se define una región R1 para seleccionar las microesferas totales
- Un diagrama FL2/SSC adquiriendo sólo la región R1 (gate de R1), donde se define una región R2 para seleccionar de forma más limpia el total de microesferas Perfect-Count.
- Un histograma FL2 adquiriendo los eventos incluidos en las regiones R1 y R2 (gate de R1\*R2), donde se definen dos regiones lineales (M1 y M2) para identificar y seleccionar las microesferas A (con menor intensidad para FL2) y microesferas B (con mayor intensidad para FL2) respectivamente. En la tabla estadística correspondiente a este histograma figuran los datos referentes al total de microesferas adquiridas y el porcentaje de esferas tipo A y tipo B detectadas. Estos datos se utilizarán en el posterior cálculo de resultados.



La discriminación de la población celular de la que se pretende realizar el recuento absoluto debe realizarse siguiendo las indicaciones del reactivo utilizado a tal efecto (combinación de AcMo utilizados). El número de eventos adquiridos que constituyen la subpoblación celular de interés será utilizado en el posterior cálculo de resultados.

#### 8.5. Cálculo de resultados

- Verificar en la tabla estadística correspondiente al histograma de FL2 que la proporción de cada tipo de microesferas tras la adquisición coincide con la proporción indicada por el fabricante. Esta información figura en el apartado de Especificaciones del Lote al final del presente manual.
- El número absoluto de la subpoblación celular de interés se determina dividiendo el número de células adquiridas correspondiente a esa subpoblación entre el número total de microesferas adquiridas (R1\*R2) y el resultado se multiplica

por la concentración de microesferas especificadas por el fabricante para este lote. Esta información figura en el apartado de Especificaciones del Lote al final del presente manual.

$$\text{Recuento absoluto (cél/}\mu\text{L)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células contadas en subpoblación de interés}}{\text{N}^\circ \text{ Total de microesferas contadas (R1} \times \text{R2)}} \times \text{N}^\circ \text{ de Perfect-Count/}\mu\text{L}$$

(valor facilitado por el fabricante)

- Si se había diluido la muestra, el resultado de esta fórmula se debe corregir con el factor de dilución aplicado.

### 8.6. Control de Calidad

- Puesto que la proporción entre los dos tipos de microesferas A y B es conocida, este producto es el único método de plataforma única para el recuento absoluto que ofrece un control interno de calidad. Perfect-Count Microesferas™ contiene 2 tipos distintos de bolas que flotan a distintos niveles en el tubo y la precisión del ensayo se comprueba verificando que la proporción de ambos tipos de bolas tras la adquisición de la muestra coincide con la indicada en el apartado de Especificaciones del Lote del presente manual.
- Consultar la ficha técnica que acompaña al reactivo utilizado para la discriminación de la población celular de la que se pretende realizar el recuento absoluto (combinación de AcMo), para obtener información sobre los procedimientos de calidad de dichos reactivos.
- Para obtener óptimos resultados se recomienda verificar la precisión de la pipeta y la calibración del citómetro con la frecuencia indicada por los fabricantes.

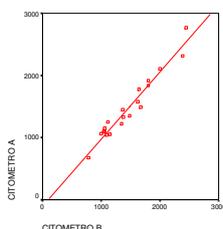
## 9. LIMITACIONES

1. La precisión en el pipeteo es el principal factor de variabilidad. Los mejores resultados se obtienen utilizando la técnica del pipeteo reverso y una pipeta correctamente calibrada. Consultar los puntos 7-9 del apartado de Advertencias y Recomendaciones para más información.
2. Se recomienda procesar las muestras de sangre dentro de las 24 horas siguientes a su extracción y las aféresis dentro de las 6 horas siguientes a su obtención.
3. No deben de usarse métodos de preparación de la muestra que requieran lavados porque puede producirse una pérdida desconocida de células, que llevaría a resultados erróneos en el recuento absoluto. En este sentido se recomienda la utilización de la solución lisante de eritrocitos QUICKLYSIS™ (CYT-QL-1) que no requiere lavados posteriores ni contiene fijador (5, 6).
4. Las muestras teñidas y lisadas deben adquirirse inmediatamente después a la adición de las Perfect-Count Microesferas™.
5. Las muestras se deben mezclar de forma manual inmediatamente antes de ser adquiridas en el citómetro de flujo para asegurar la mezcla homogénea de células y microesferas.
6. La sensibilidad del método depende del número de eventos adquiridos, para obtener un valor preciso de recuento absoluto se recomienda detener la adquisición cuando en la región de microesferas totales se hayan adquirido de 1.000 a 20.000 eventos (1).
7. Los recuentos de microesferas pueden variar según el lote. Se debe utilizar siempre el recuento de microesferas totales y los márgenes de aceptabilidad entre la proporción de esferas tipo A y tipo B del lote de reactivo que se está utilizando.
8. Los resultados obtenidos pueden ser erróneos si se adquieren en un citómetro desalineado o las ventanas de adquisición y/o análisis se fijan de forma inadecuada.

## 10. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

### 10.1. Precisión

Para evaluar la precisión del método, se preparó un estudio con 20 muestras por duplicado adquiridas en dos citómetros distintos. En la siguiente figura se muestran los resultados, apreciándose un nivel de correlación de  $r^2=0,97$ .



$$Y = -100.764 + 1.081 x$$

### 10.2. Exactitud

Se compararon en 104 muestras de individuos HIV+ los recuentos absolutos de linfocitos CD4+ obtenidos con Perfect-Count Microesferas™ con los obtenidos con los tubos TruCount y el software de análisis MultiSET (3). Los resultados del análisis de regresión se muestran en la siguiente tabla:

Numero de muestras	Diferencia media. cél CD4+/ $\mu\text{l}$	Desviación estándar (SD)	Coefficiente correlación ( $r^2$ )	Pendiente	Intersección en el eje Y	Intervalo confianza 95%
104	27	47	0.99	0.9781	-12,61	9

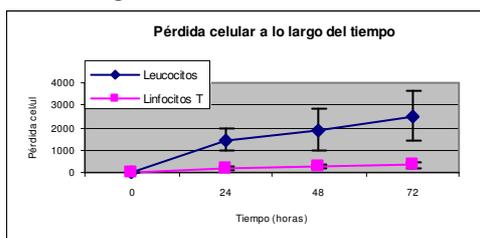
### 10.3. Reproducibilidad:

Se evaluó el recuento celular de linfocitos T (CD3+), linfocitos B (CD19+) y células NK (CD56+) en 3 medidas repetidas de una misma muestra. En la siguiente tabla se muestra el valor absoluto medio, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) obtenido para cada una de las subpoblaciones celulares analizadas en 5 muestras diferentes:

Muestra	LINFOCITOS T CD3+			LINFOCITOS B CD19+			CÉLULAS NK CD56+		
	Cel/ $\mu\text{L}$ MEDIA	SD	CV	Cel/ $\mu\text{L}$ MEDIA	SD	CV	Cel/ $\mu\text{L}$ MEDIA	SD	CV
1	1479	79,65	5,38	271	15,14	5,58	88	9,71	11,03
2	1970	67,21	3,41	348	16,09	4,62	118	9,84	8,33
3	2120	14,22	0,67	432	19,69	4,55	134	11,54	8,61
4	1159	20,55	1,77	299	3,21	1,07	172	6,65	3,86
5	1317	19,51	1,48	139	4,72	3,39	204	14	6,86

### 10.4. Estabilidad

Para probar la estabilidad de la muestra se evaluaron los resultados obtenidos con la misma muestra después de ser procesada inmediatamente después de la extracción, 24 horas después de la extracción, 48 horas después de la extracción y 72 horas después de la extracción. En la tabla siguiente se muestra el valor absoluto de pérdida celular detectado para la población de leucocitos y linfocitos a lo largo del tiempo. En base a los resultados obtenidos, se recomienda procesar las muestras de sangre dentro de las 24 horas siguientes a su extracción.



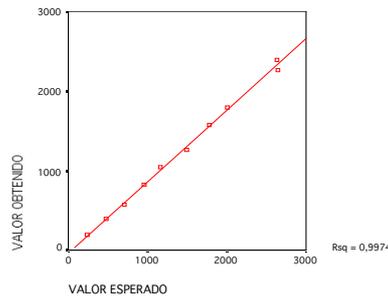
Para probar la estabilidad de la muestra una vez procesada se evaluaron los resultados obtenidos con la misma muestra tras adquirirla inmediatamente después de su preparación, a las 2 horas, a las 4 horas, a las 6 horas y a las 8 horas después de su preparación. El estudio se realizó en muestras duplicadas que se almacenaron a temperatura ambiente y a 2-8°C. Valorando el número de Perfect-Count Microesferas™ detectadas, el resultado del control interno de calidad que ofrece este sistema y el número absoluto de linfocitos T (CD3+), linfocitos B (CD19+) y células NK (CD56+) calculado a partir del número de esferas detectadas, se recomienda adquirir la muestra en el citómetro de flujo inmediatamente después de su preparación.

MUESTRAS ALMACENADAS A 2-8°C	CONTROL INTERNO	PCM CONTADAS	RECUENTO CD3+/ $\mu\text{l}$	RECUENTO CD19+/ $\mu\text{l}$	RECUENTO CD56+/ $\mu\text{l}$
0 HORAS	OK	1251	1362	220	87
2 HORAS	OK	1149	1616	239	81
4 HORAS	NO VALIDO	1003	1932	276	125
6 HORAS	NO VALIDO	974	2073	279	124
8 HORAS	NO VALIDO	857	2528	404	203

MUESTRAS ALMACENADAS A TEMPERATURA AMBIENTE	CONTROL INTERNO	PCM CONTADAS	RECUENTO CD3+/ $\mu\text{l}$	RECUENTO CD19+/ $\mu\text{l}$	RECUENTO CD56+/ $\mu\text{l}$
0 HORAS	OK	1345	1360	207	80
2 HORAS	NO VALIDO	1016	1823	278	105
4 HORAS	NO VALIDO	725	2904	422	99
6 HORAS	NO VALIDO	771	2931	520	476
8 HORAS	NO VALIDO	770	2913	533	560

### 10.5. Linealidad

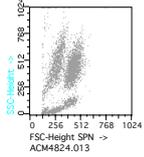
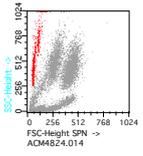
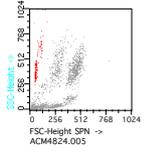
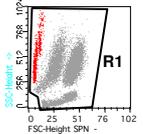
Se midieron 10 diluciones seriadas de una muestra de sangre normal para comprobar la escala de concentración de células CD3+ obtenidas. Los resultados muestran un excelente nivel de correlación de los resultados obtenidos con los esperados en base a la dilución efectuada ( $r^2=0,997$ ).

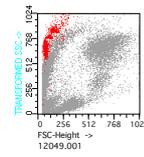
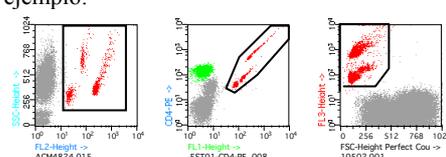
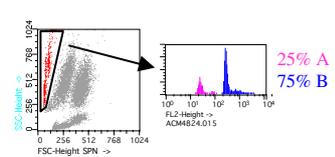
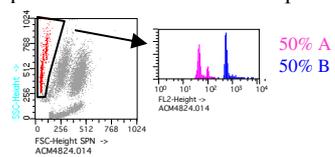


## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mandy F and Brando B. In Current Protocols in Cytometry 6.8.1-6.8.26 (2000) John Wiley&Sons, Inc.
2. European Working Group on Clinical Analysis (EWGCCA) Cytofluorometric methods for assessing absolute number of cell subsets in blood. Cytometry (Comm. Clin. Cytometry) 42: 327-346 (2000)
3. Storie I, Sawle A, Goodfellow K, Whitby L, Granger V, Ward RY, Peel J, Smart T, Reilly JT, Barnett D. Perfect-Count : A novel approach for the single platform enumeration of absolute CD4+ T-lymphocytes. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 57B:47-52 (2004).
4. Protection of Laboratory Workers from occupationally acquired infections. Second edition; approved guideline (2001). Villanova PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document M29-A2.
5. 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)
6. 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)
7. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture-approved standard; Fifth edition (2003). Wayne PA: National Committee for clinical laboratory standards. NCCLS document H3-A5.

## 12. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS Perfect-Count Microesferas™

PROBLEMA	SOLUCIÓN POSIBLE
<p>No se detectan las esferas en las gráficas de FSC/SSC</p> 	<p>1.- Disminuir hasta valor 0 el umbral (Threshold o Discriminator) del citómetro.</p>  <p>2.-Comprobar que se está adquiriendo el total de eventos y no una región previamente definida.</p>
<p>Entre los eventos de la adquisición la gran mayoría son restos celulares y células muertas</p> 	<p>1.-Repetir la adquisición después de algunos minutos para asegurarnos que la muestra está bien lisada.</p> <p>2.- Dibujar una región que excluya los restos celulares y las células muertas y adquirir la muestra guardando sólo los eventos incluidos en esta región. De esta forma se enriquece la adquisición en células vivas.</p>  <p>Adquirir la región R1</p>

<p>Dificultad para definir las Perfect-Count Microesferas™ en la gráfica de FSC/SSC porque se mezclan con las células.</p> 	<p>Al ser microesferas fluorescentes podemos identificarlas en base a su expresión en las distintas fluorescencias del citómetro. Dependiendo de los marcadores con los que combinemos la muestra podemos encontrar diferentes soluciones alternativas. Aquí se muestra algún ejemplo.</p> 
<p>Las proporciones entre ambos tipos de esferas no cumplen con las especificaciones de lote</p> 	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.-Comprobar que el vial de esferas ha sido mezclado y homogeneizado previamente a la preparación de la muestra y que también ha sido homogeneizado el tubo con la muestra ya procesada.</li> <li>2.-Comprobar que el umbral está lo suficientemente bajo como para que no corte a uno de los 2 tipos de esferas</li> </ol>  <ol style="list-style-type: none"> <li>3.-Comprobar que la velocidad de adquisición ha sido media o baja</li> <li>4.-Si el problema persiste, repetir la adquisición en otro citómetro para descartar un desajuste en el sistema de presiones del aparato.</li> <li>5.-Si a pesar de haber seguido los pasos anteriores sigue obteniendo proporciones erróneas, consulte con el servicio de asistencia técnica de Cytognos, SL: <a href="mailto:support@cytognos.com">support@cytognos.com</a></li> </ol>

### **13. GARANTÍA:**

Este producto está garantizado solo en cuanto a su conformidad con la cantidad y el contenido indicados en la etiqueta. No hay 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.

### **14. ESPECIFICACIONES DEL LOTE:**

