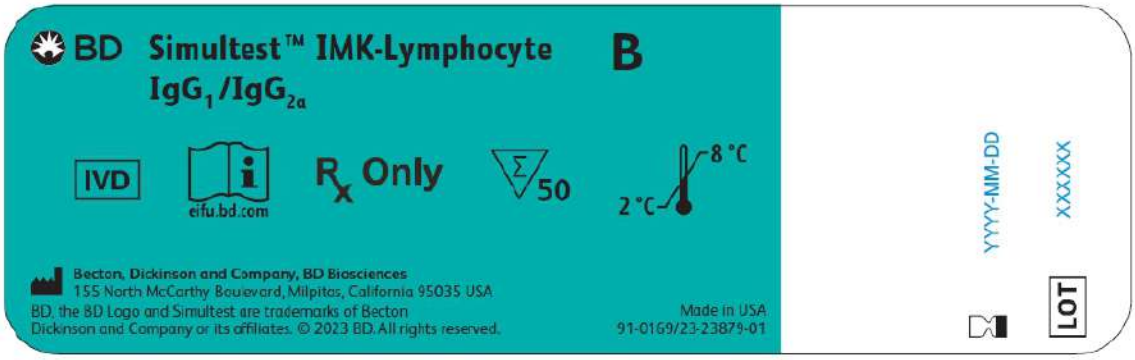
BECTON DICKINSON ARGENTINA S.R.L.
Av. Del Libertador 110 2° Piso - C.P. B1638BEN
Vicente López – Buenos Aires - Argentina
Tel.: 0800-444-5523

BD
Advancing the world of health

Rótulos Internos

Simultest™ IMK- Lymphocyte REF: 340182 Juego de 7 reactivos



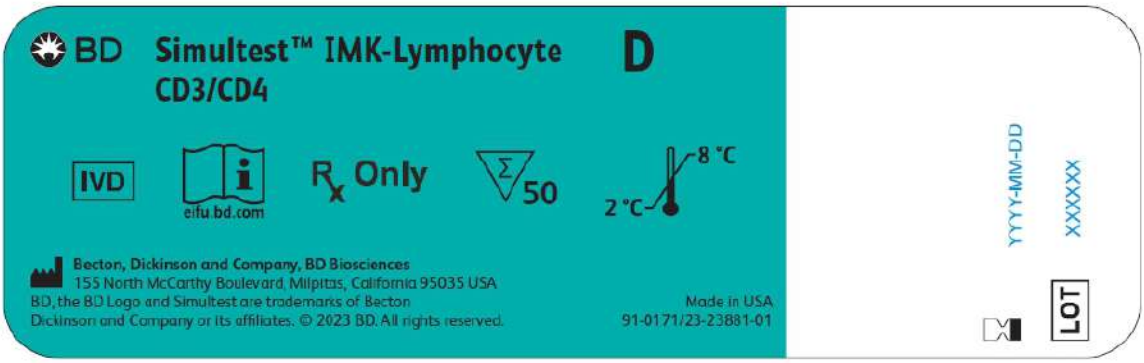


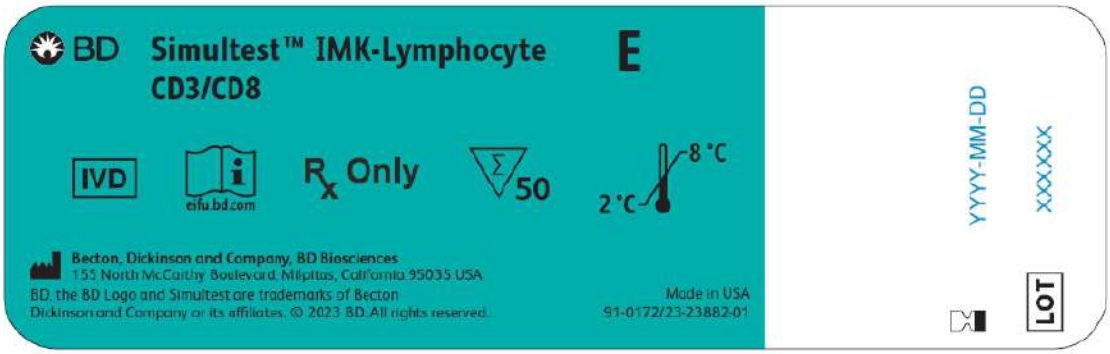


ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico Apoderado

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

BD
Advancing the world of health







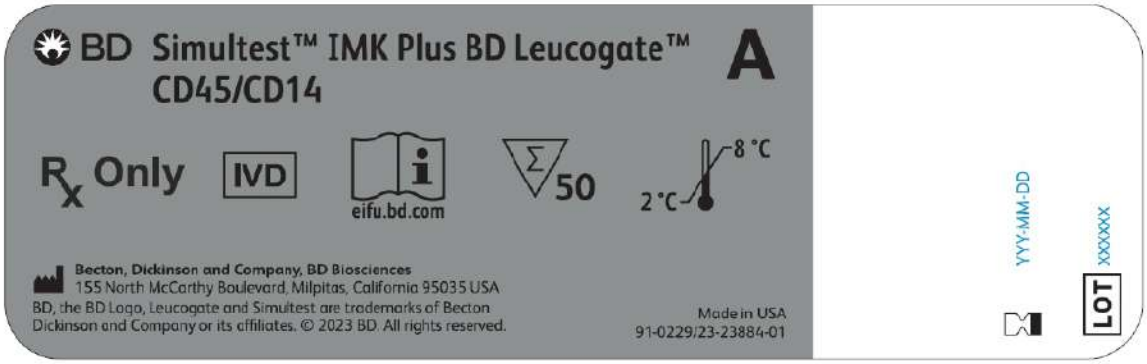
ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

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

BD
Advancing the world of health



Simultest™ IMK- Plus REF: 349217 Juego de 7 reactivos

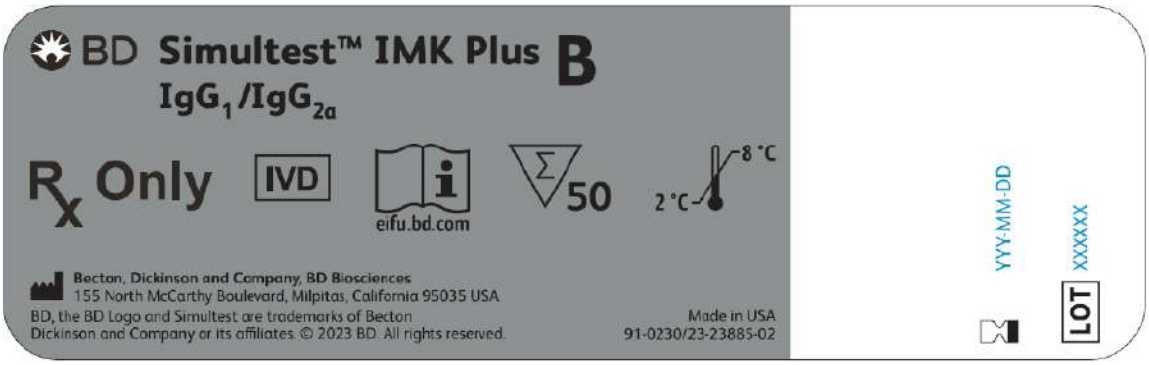


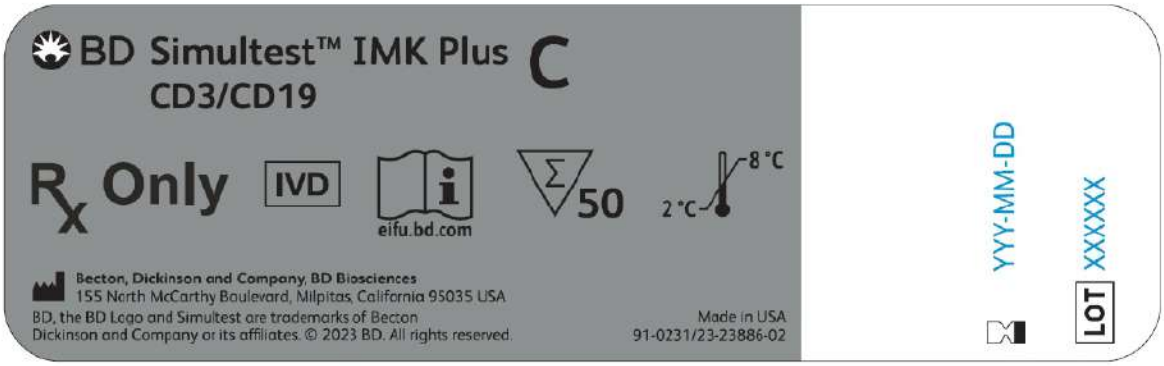
ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

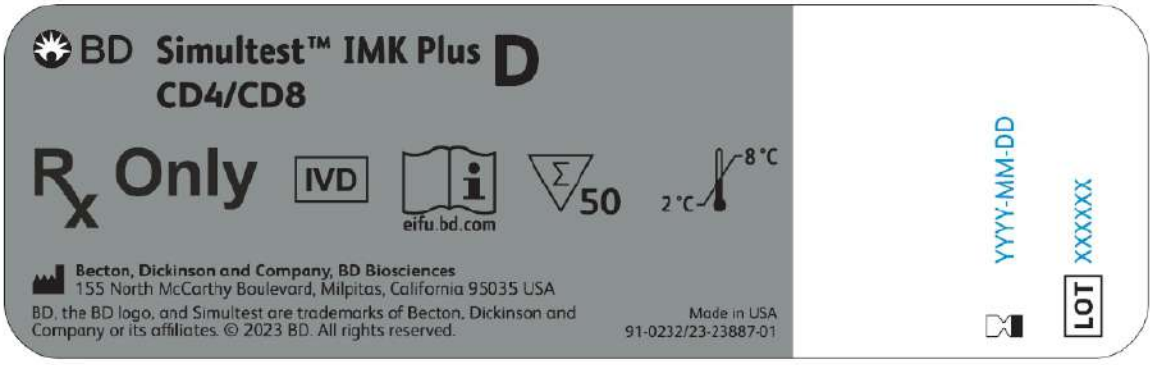
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

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

BD
Advancing the world of health



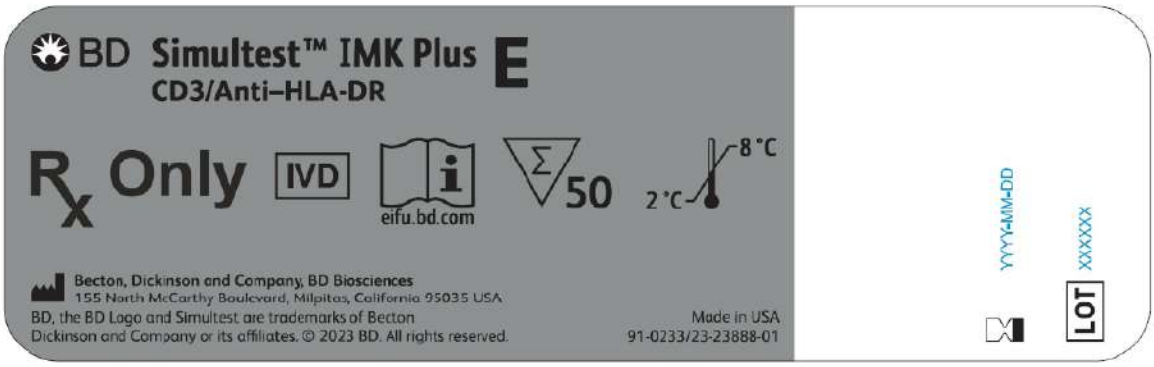


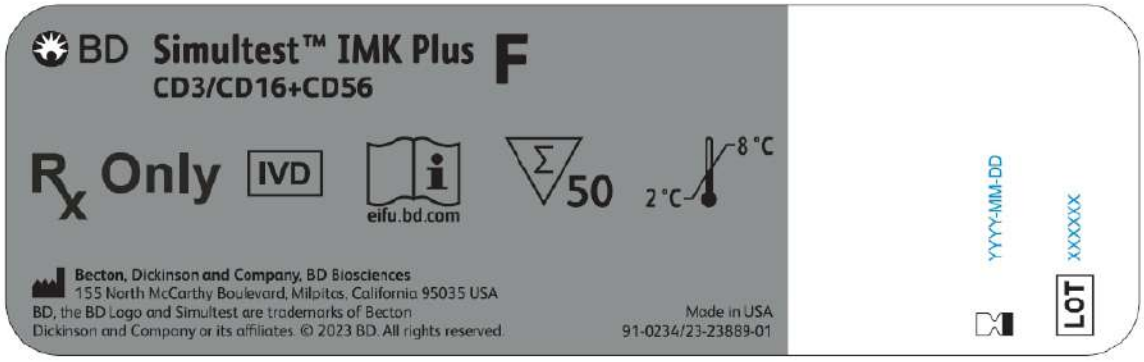


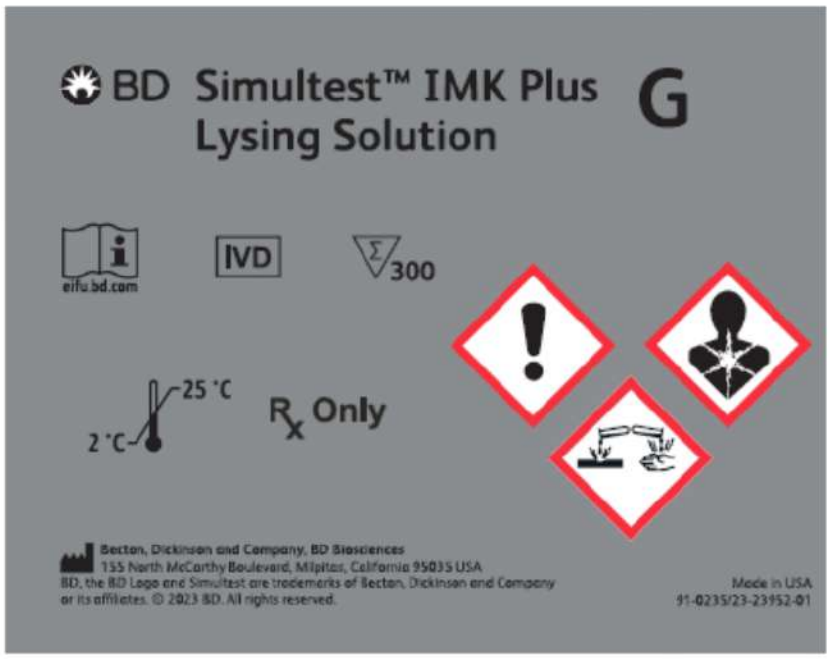
ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

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

BD
Advancing the world of health





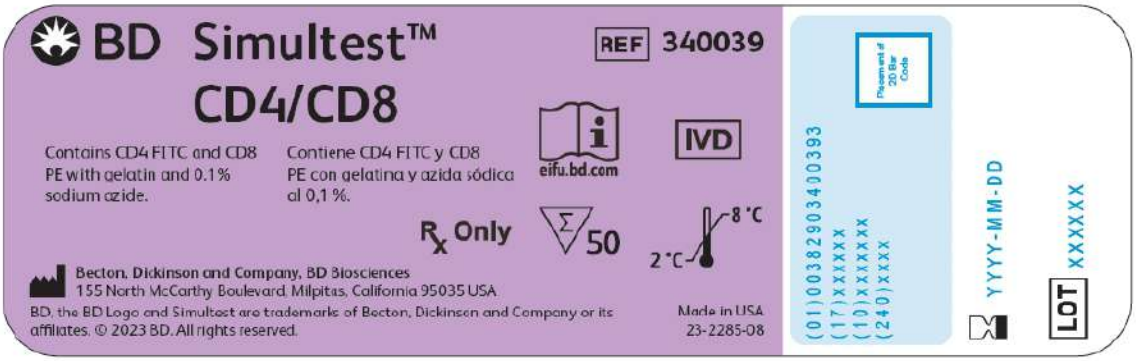


ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15843
Co Director Técnico - Apoderado

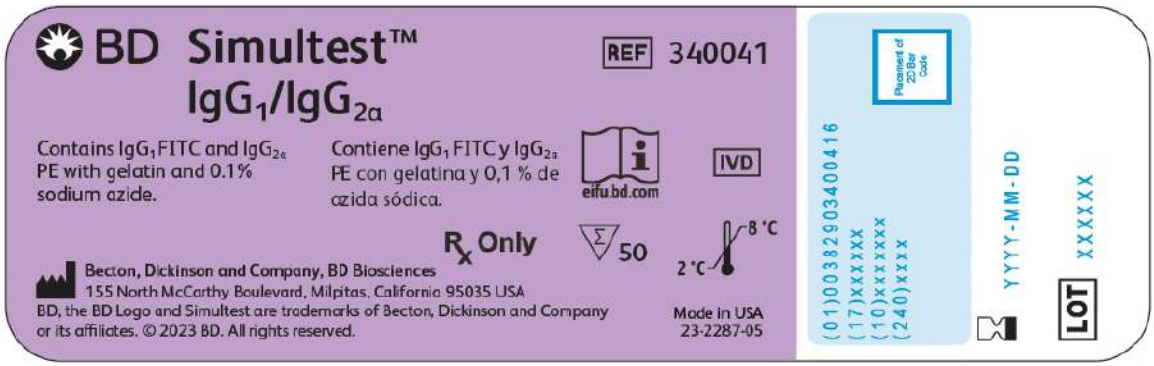
BECTON DICKINSON ARGENTINA S.R.L.
Av. Del Libertador 110 2° Piso - C.P. B1638BEN
Vicente López – Buenos Aires - Argentina
Tel.: 0800-444-5523

BD
Advancing the world of health

Rótulos Externos







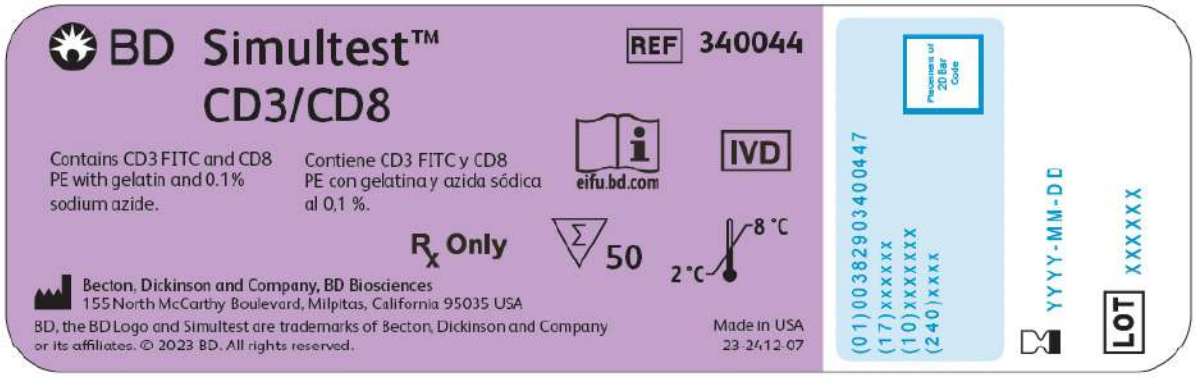
ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Apoderado

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

BD
Advancing the world of health





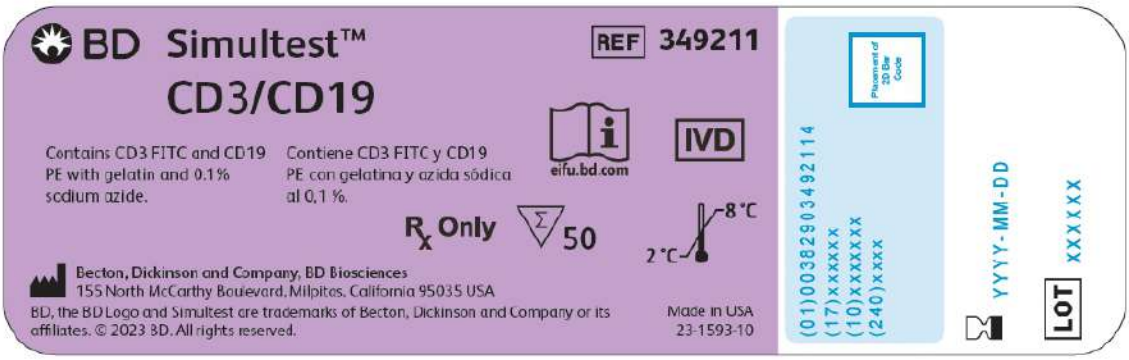


ESTEBAN ZORZOLI

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

BD
Advancing the world of health







ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15843
Co Director Técnico - Apoderado

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

BD
Advancing the world of health



ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

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

BD
Advancing the world of health

BD Simultest™ IMK-Lymphocyte REF 340182

For enumeration of human leucocyte subsets in whole blood. Contents: Conjugated murine monoclonal antibodies to cell-surface antigens and 10X buffered lysing solution.

Pour la numération des sous-populations de leucocytes humains dans le sang total. Contenu : Anticorps monoclonaux de souris conjugués aux antigènes de surface cellulaire et une solution de lyse tampon 10X.

Para la enumeración de subgrupos de leucocitos en sangre entera. Contenido: Anticuerpos monoclonales conjugados murínicos contra antígenos de superficie celular y solución para la lisis 10X tamponada.



BD Simultest™ IMK-Lymphocyte REF 340182

A. BD Leucogate™ (CD45/CD14)
B. IgG_1/IgG_{2a}
C. CD3/CD19
D. CD3/CD4
E. CD3/CD8
F. CD3/CD16+CD56
G. lysing Solution



Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences
155 North McCarthy Boulevard, Milpitas, California 95035 USA
BD, the BD Logo, Leucogate and Simultest are trademarks of Becton, Dickinson and Company or its affiliates.
© 2023 BD. All rights reserved.

Made in USA
23-2560-07

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

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

BD
Advancing the world of health

Sobre rótulo

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, Prov. Buenos Aires, Argentina.
Teléfono: 0800-444-5523
E-mail: crc_argentina@bd.com

Directora Técnica: Paula Rao, Farmacéutica MN N° 17.813

USO PROFESIONAL EXCLUSIVO

UTORIZADO POR LA ANMAT N° PM 634-644

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

Instrucciones de uso

BD Simultest™ CD3/CD19

Para la determinación de células T y B humanas en sangre periférica

50 análisis, n.º de catálogo 349211

23-2609(04)
2023-08
Español

℞ Only IVD

1. USO PREVISTO

BD Simultest™ CD3/CD19 (Leu-4/12) es un reactivo de inmunofluorescencia directa de dos colores que se utiliza para enumerar porcentajes de linfocitos T y B humanos maduros en sangre completa con eritrocitos lisados (LWB).

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los linfocitos humanos pueden dividirse en tres poblaciones principales basándose en su función biológica y en la expresión de antígenos de superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos citolíticos naturales (NK). Los linfocitos T participan en la inmunidad mediada por células específicas del antígeno y regulan la secreción de inmunoglobulina por los linfocitos B. Los linfocitos T se pueden clasificar también según sus propiedades funcionales como colaboradores/inductores y supresores/citotóxicos.

Aplicaciones clínicas

NOTA No en todos los estudios de esta sección se han empleado reactivos de BD.

Los porcentajes totales de linfocitos T ($CD3^+$) y linfocitos B ($CD19^+$)se utilizan para caracterizar y controlar algunas formas de enfermedades de inmunodeficiencia[1,2] y enfermedades autoinmunitarias.[3-5]

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se añaden reactivos de anticuerpos monoclonales a la sangre humana completa, los anticuerpos marcados con fluorocromo se unen específicamente a los antígenos de la superficie de los leucocitos. Los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse para identificar subpoblaciones de linfocitos.

Una muestra parcial (alícuota) del paciente teñida se introduce en el citómetro de flujo y pasa en una estrecha corriente a través del trayecto de un haz de láser. Las células teñidas emiten fluorescencia cuando las excita el haz del láser, y la luz emitida se recoge y procesa mediante el citómetro de flujo.

4. REACTIVO

Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis

El reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 (suficiente para 50 análisis) se suministra en 1 ml de solución salina tamponada con gelatina y azida sódica al 0,1 %. Contiene CD3 marcado con FITC (Leu-4), clon SK7,[6-9] para la identificación de linfocitos T y CD19 marcado con PE (Leu-12), clon 4G7,[10] para la identificación de linfocitos B. La relación fluoresceína-proteína (F:P) para los reactivos de anticuerpos monoclonales IgG de BD es de 2–5. La relación F:P para CD3 (Leu-4) FITC se ha optimizado para su uso previsto.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

El anticuerpo CD3 (Leu-4) está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 de ratón y cadenas ligeras kappa. CD3 reacciona con la cadena épsilon del complejo CD3/receptor del antígeno de células T (TCR).[11] Este complejo está formado por al menos seis proteínas, con pesos moleculares de 20–30 kilodaltons (kDa).[12] El antígeno reconocido por anticuerpos CD3 se asocia de forma no covalente a TCR α/β o γ/δ (70–90 kDa).[13]

El anticuerpo CD19 (Leu-12) está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 de ratón y cadenas ligeras kappa. El antígeno reconocido por los anticuerpos CD19 está presente en los linfocitos B humanos en todas las fases de maduración, pero se pierde en las células plasmáticas. El antígeno CD19 puede intervenir en la activación y proliferación de linfocitos B.[14] El peso molecular del antígeno CD19 es de 90 kDa.[14]

Precauciones

- Para uso diagnóstico in vitro.
- Cuando se almacena a una temperatura de 2–8 °C, el reactivo de anticuerpo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No se debe utilizar después de la fecha de caducidad.
- El reactivo de anticuerpo no se debe congelar ni exponer a la luz directa durante el almacenamiento o la incubación con células. Mantenga seco el vial del reactivo.
- Cualquier alteración en el aspecto del reactivo, como la precipitación o decoloración, es un indicio de inestabilidad o deterioro. En ese caso, no utilice el reactivo.
- El reactivo del anticuerpo contiene azida sódica como conservante. Sin embargo, es preciso extremar las precauciones para evitar la contaminación microbiana, que podría causar resultados erróneos.

ADVERTENCIA Se consideran de riesgo biológico todas las muestras biológicas y todos los materiales que hayan entrado en contacto con ellas. Manipular como si pudieran transmitir alguna infección[15,16] y desechar tomando las precauciones adecuadas según la normativa federal, estatal y local. Nunca pipetee con la boca. Utilice ropa protectora, protección ocular y guantes adecuados.

Las concentraciones se muestran en la tabla siguiente:

Reactivo	Concentración (µg/ml)
CD3 FITC	25,0
CD19 PE	3,1

5. INSTRUMENTO

El reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 está diseñado para utilizarse en un citómetro de flujo de BD que esté equipado con el hardware, el software y la electrónica de conmutación adecuados. El citómetro de flujo debe estar equipado para detectar fluorescencia de dos colores, dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC). Se recomienda utilizar el software BD Simulset™, versión 2.5 o posterior, para la adquisición y el análisis de datos.

Todas las características de rendimiento se obtuvieron con un citómetro de flujo BD FACScan™ y se verificaron en un citómetro de flujo BD FACStrak™. Es posible que los demás sistemas tengan características distintas, por lo que el usuario deberá verificarlos.

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Extraiga la sangre de forma aséptica por venopunción[17,18] en un BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tube estéril o equivalente. Para este procedimiento se necesita como mínimo 1 ml de sangre completa. Para

ESTEBAN ZORZOLI Farmacéutico - M.N. 15643 Apoderado

obtener resultados óptimos, la sangre debe teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. La sangre con anticoagulante puede almacenarse a temperatura ambiente (20–25 °C) durante un máximo de 6 horas, hasta que esté lista para la tinción. Las muestras de sangre que se refrigeren antes de la tinción pueden arrojar resultados anómalos.

Debe hacerse un recuento de leucocitos y una fórmula leucocitaria de la misma muestra de sangre completa antes de la tinción. Se considera aceptable un intervalo de concentración de leucocitos de $3,5 \times 10^3$–$9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl.

Las muestras con hemogramas superiores a $9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl deben diluirse con una solución salina amortiguada con fosfato (PBS) 1X, que contenga azida sódica al 0,1 %. Para muestras con recuentos inferiores a $3,5 \times 10^3$ leucocitos/µl podría ser necesaria más sangre, así como un procedimiento de separación para concentrar las células.

Condiciones que causan interferencias

No deben utilizarse muestras de pacientes previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre completa que se refrigeren antes de la tinción pueden arrojar resultados anómalos. Para obtener resultados óptimos, las muestras de sangre deben teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. Las muestras obtenidas de pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores pueden ofrecer una escasa diferenciación.[19] La presencia de blastocitos o de eritrocitos no lisados o nucleados puede interferir en los resultados del análisis. Las muestras hemolizadas deben rechazarse. Siga las indicaciones del fabricante del tubo de recogida para conocer cuál es el volumen mínimo de sangre que se debe recoger.

PRECAUCIÓN Tome las precauciones habituales al recoger, manipular y desechar todas las muestras de sangre humana y reactivos potencialmente cancerígenos.

7. PROCEDIMIENTO

Reactivo suministrado

Consulte Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis y Precauciones en la sección 4, Reactivo.

Reactivos y materiales necesarios que no se suministran

- Reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (CD45/CD14), 1 ml (n.º de catálogo 340040). Para determinar el área de selección de los análisis de linfocitos, consulte las instrucciones de uso de BD Simultest™ Leucogate, el documento *BD Monoclonal Antibodies Source Book* (Manual de anticuerpos monoclonales de BD), sección 5.2, y el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™). Conserve a 2–8 °C.
- BD Simultest™ Control γ_1/γ_{2a} (IgG_1 FITC/IgG_{2a} PE) (ambos específicos de hemocianina de lapa californiana), 1 ml (n.º de catálogo: 340041). Conserve a 2–8 °C.
- BD FACS™ Lysing Solution (10X), 100 ml (n.º de catálogo 349202). Conserve a 2–25 °C. Para usarlo, diluya a 1:10 con agua apta para reactivos a temperatura ambiente (20–25 °C). Conserve en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente. La solución preparada se mantendrá estable durante un mes a temperatura ambiente. Consulte las instrucciones de uso de BD FACS™ Lysing Solution.
- BD Calibrite™ Beads (n.º de catálogo 349502). Para obtener información de uso detallada, consulte las instrucciones de uso de BD Calibrite™ Beads.
- BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tubes o equivalentes.
- Tubos de ensayo Falcon® desechables de poliestireno de 12 × 75 mm o equivalentes.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

- Agitador vorticial.
- Centrífuga de baja velocidad (velocidad mínima 200 *g*) con rotor de cesto giratorio y soportes para tubos de 12 × 75 mm.
- Aspirador de vacío con depósito.
- Micropipeta con puntas.
- Tampón de lavado de PBS con azida sódica al 0,1 %.
- Solución fijadora (solución de paraformaldehído [PFA] al 1 % en PBS 1X con azida sódica al 0,1 %).

  Almacene a una temperatura de 2–8 °C en un recipiente de vidrio ámbar durante un máximo de 1 semana.
- BD FACSFlow™ Sheath Fluid (n.º de catálogo 342003) o equivalente.

  PRECAUCIÓN Utilice únicamente diluyente BD FACSFlow™ Sheath Fluid para diluir BD Calibrite™ Beads.
- Agua apta para reactivos (destilada y desionizada).

Tinción y fijación de las células

Las muestras de sangre completa se tiñen primero con los reactivos BD Simultest™ Leucogate (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y BD Simultest™ CD3/CD19 (tubo C). Después de la tinción, se utiliza BD FACS™ Lysing Solution diluida (1X) para lisar los eritrocitos. Evite exponer los tubos a la luz directa. Realice el procedimiento a temperatura ambiente (20–25 °C) utilizando reactivos a temperatura ambiente. Consulte el punto Precauciones en la sección 4, Reactivo.

1. Para cada muestra de paciente, etiquete tres tubos A, B y C de 12 × 75 mm. Además, etiquete cada tubo con el número de identificación de la muestra.
2. Coloque 20 µl de reactivo BD Simultest™ Leucogate en el tubo A, 20 µl de reactivo BD Simultest™ Control en el tubo B y 20 µl de reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 en el tubo C.
3. Para cada tubo de muestra, utilice una punta de micropipeta nueva y añada con cuidado 100 µl de sangre completa con anticoagulante bien mezclada en el fondo de cada uno de los tres tubos etiquetados. La concentración de leucocitos recomendada es de $3{,}5 \times 10^3$–$9{,}4 \times 10^3$ leucocitos/µl. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 15–30 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

   NOTA Proteja las muestras de la luz directa durante este procedimiento de incubación y tenga cuidado para evitar que se vierta sangre por el lateral del tubo. Si queda sangre completa en el lateral del tubo, no se teñirá con el reactivo.
4. Diluya la BD FACS™ Lysing Solution (10X) a 1X siguiendo las instrucciones que figuran en el punto Reactivos y materiales necesarios que no se suministran de la sección 7, Procedimiento. Añada 2 ml de BD FACS™ Lysing Solution 1X a temperatura ambiente (20–25 °C) en cada tubo. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 10–12 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (20–25 °C). No incube durante más de 12 minutos.

   NOTA Evite la exposición prolongada de las células a los reactivos líticos, ya que podría provocar la destrucción de leucocitos.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

5. Inmediatamente después de la incubación, centrifugue los tubos a 300 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).
6. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.
7. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para volver a suspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 2 ml de PBS con azida sódica al 0,1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Centrifugue a 200 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).
8. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.
9. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para volver a suspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 0,5 ml de paraformaldehído al 1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Compruebe que las células estén bien mezcladas con la solución fijadora.
10. Las células ya están listas para analizarse en el citómetro de flujo. Tape o cubra los tubos preparados y almacénelos a una temperatura de 2–8 °C en un lugar oscuro hasta el momento del análisis por citometría de flujo. Analice las células fijadas dentro de un plazo de 24 horas después de la tinción. Agite a conciencia las células en el agitador vorticial a baja velocidad para reducir la agregación celular antes de realizar el análisis a través del citómetro de flujo.[20]

Citometría de flujo

Siga las instrucciones de BD para el análisis por citometría de flujo bicolor.

Control de calidad

Para obtener resultados óptimos, se recomienda utilizar BD Calibrite™ Beads y el software AutoComp™ para configurar los voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT), ajustar la compensación de fluorescencia y verificar la sensibilidad del instrumento antes de usar el reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 en un citómetro de flujo BD FACScan™.

Se recomienda analizar diariamente una muestra de control de un sujeto adulto normal para optimizar los parámetros del instrumento y como comprobación de control de calidad del sistema. En la figura 1 se muestran los resultados correctos para una muestra de un paciente normal desde el punto de vista hematológico.

El reactivo BD Simultest™ Control se procesa con cada muestra de paciente para definir los marcadores de fluorescencia 1 (FL1) y fluorescencia 2 (FL2) entre grupos de linfocitos teñidos negativa y positivamente, así como para detectar la presencia de tinción inespecífica, que indicaría resultados erróneos del paciente.

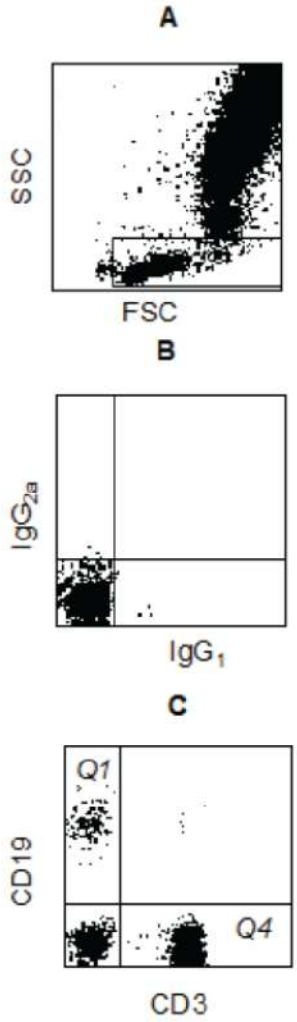
Examine visualmente el gráfico de puntos correspondiente al tubo B de reactivo BD Simultest™ Control. Si el grupo negativo es difuso y está esparcido por el intervalo de intensidad de FL2, puede que el marcador no se haya ajustado correctamente y que los resultados no sean fiables.

El software BD Simulset™ examinará automáticamente los datos y alertará al operador mediante una serie de posibles mensajes de error. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para obtener una lista con los posibles mensajes.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Figura 1 Muestra de LWB de BD FACScan™, de un paciente hematológicamente normal, teñida con reactivos BD Simultest™ Leucogate (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y BD Simultest™ CD3/CD19 (tubo C).



NOTA El reactivo BD Simultest™ Leucogate se utilizó para reducir los residuos, los monocitos y los granulocitos en el área de selección que se muestra para el tubo A. Se muestran gráficos de puntos de FL1 (eje X) frente a FL2 (eje Y) para los tubos B y C.

Utilice los criterios siguientes para el examen de los gráficos de puntos obtenidos para cada muestra con el fin de evaluar la calidad de los datos obtenidos.

- El operador debe rechazar los resultados si recibe uno o más de los mensajes de error siguientes para el control normal: no separation between cellular populations (no hay separación entre poblaciones celulares); too few lymphocytes (less than 500) (linfocitos demasiado escasos [menos de 500]); excessive RBC or nucleated RBC contamination and debris (greater than 10%) (contaminación con eritrocitos excesivos o eritrocitos nucleados y residuos [superior al 10 %]); o excessive monocyte (greater than 3%) or granulocyte (greater than 6%) contamination of the lymphocyte gate (contaminación excesiva con monocitos [superior al 3 %] o granulocitos [superior al 6 %] del área de selección de linfocitos).

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico
M.N. 5643
Apoderado
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

- Si no hay un motivo obvio para que falle el control normal, debe teñirse y procesarse una muestra de otro control normal y repetirse todo el procedimiento de tinción en todas las muestras siguientes.
- Las muestras con eritrocitos nucleados pueden contener un exceso de residuos debido a una lisis incompleta de estos con BD FACS™ Lysing Solution. El exceso de residuos también podrá presentarse cuando se analicen muestras de sangre de pacientes con determinados trastornos hematológicos que dificulten la lisis de los eritrocitos, como mielofibrosis y esferocitosis. Los eritrocitos nucleados se contarán como residuos y, si estos superan el 10 %, el software marcará la muestra como «too many nonlymphs in gate» (demasiadas células distintas de linfocitos en el área de selección) y sus resultados deberán rechazarse.
- La diferencia entre tubos en los eventos incluidos en el área de selección debe ser inferior o igual a 500 eventos para todos los tubos del panel, excepto para el reactivo BD Simultest™ Leucogate (tubo A). (Sin embargo, si el tubo del reactivo BD Simultest™ Control presenta problemas, el panel no será fiable).

8. RESULTADOS

Porcentaje de conversión de linfocitos

Cuando se realiza el cálculo del porcentaje de conversión de linfocitos, la subpoblación de linfocitos $CD3^+$ y la subpoblación de linfocitos $CD19^+$ se tratan como un porcentaje de los linfocitos incluidos en el área de selección para el análisis de linfocitos. Si no se realiza el cálculo, los resultados se indican como un porcentaje de los eventos del área de selección.

Fórmula leucocitaria en tres partes

Para la sangre completa lisada, es posible calcular los monocitos, los linfocitos y los granulocitos como un porcentaje de los leucocitos utilizando el reactivo BD Simultest™ Leucogate (tubo A). El software BD Simulset™ calcula automáticamente una fórmula leucocitaria en tres partes. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para obtener impresiones de datos representativos.

NOTA La fórmula leucocitaria proporcionada por el software BD Simulset™ debe utilizarse solamente para realizar una comparación con una fórmula leucocitaria independiente con fines de control de calidad y no debe sustituir a una fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente en las historias clínicas de los pacientes ni introducirse en el software BD Simulset™ para obtener recuentos absolutos.

Recuentos absolutos

Se podrá calcular un hemograma completo si se obtiene un porcentaje de leucocitos y linfocitos a partir de una fórmula leucocitaria mediante procedimientos de laboratorio estándar. Para obtener instrucciones de cálculo de hemogramas completos, consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™).

9. LIMITACIONES

- Es necesario que los laboratorios definan sus propios intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 que puedan verse afectados por el sexo o la edad del paciente, así como la técnica utilizada en la preparación. La raza del paciente también puede influir, aunque aún no se dispone de suficientes datos para respaldar esta afirmación. Es necesario conocer la edad, el sexo, el estado clínico y la raza de los sujetos a la hora de determinar un intervalo de referencia.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico
Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

- Los resultados del reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 deben utilizarse junto con otra información obtenida de la evaluación clínica y procedimientos de diagnóstico independientes adicionales.
- El reactivo CD3/CD19 no está diseñado para la discriminación de muestras por la presencia de células leucémicas, ni para utilizarse en muestras fenotípicas de pacientes con leucemia. La presencia de blastocitos podría impedir que el reactivo BD Simultest™ Leucogate defina un área de selección de análisis de linfocitos adecuada. El software marcará la muestra y no se imprimirán los resultados.
- Los valores de recuento absoluto de las subpoblaciones de linfocitos podrían no ser comparables entre laboratorios debido a las variaciones en los métodos de determinación de recuentos de linfocitos, fórmulas leucocitarias, o ambos.

10. VALORES ESPERADOS

Subpoblaciones de leucocitos

La población de linfocitos B presente en el cuadrante 1 (C1) y la población de linfocitos T presente en el cuadrante 4 (C4) del tubo C se muestran en la figura 1 y en el documento *Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™). Los resultados clínicamente significativos se encuentran en el informe del médico.

BD ha investigado los intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 en 160 sujetos masculinos y femeninos normales mediante el citómetro de flujo BD FACScan™ en seis centros (cinco centros clínicos europeos y un centro de EE. UU.). Los intervalos de referencia normales previstos de linfocitos T y B para LWB se muestran en la tabla 1.[21]

Tabla 1 Intervalos de referencia representativos para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 en adultos hematológicamente normales como porcentajes de los linfocitos del área de selección totales (convertidos) (datos agrupados de seis centros clínicos)

Parámetro	Sexo	Edad	n	Media (%)	Intervalo del 95 %[a]
Linfocitos T totales	Ambos	18–70	160	72	59–85
Linfocitos B totales	Ambos	18–70	160	13,0	6,4–23

No se deben utilizar los intervalos de referencia para adultos con muestras de sangre de pacientes pediátricos.

La raza puede ser una variable en la definición de los intervalos de referencia normales[22], aunque BD no ha recopilado datos suficientes para determinarlo.

NOTA Los valores normales previstos pueden variar según la edad, el sexo o la raza del paciente. Debido a estas diferencias, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia normal para cada parámetro.

11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El rendimiento del reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 se estableció mediante análisis en un centro clínico de EE. UU., en los laboratorios de BD de San José (California) o en ambos.

Reproducibilidad intramuestral

En la tabla 2 se muestra la reproducibilidad intramuestral media obtenida tanto para sujetos normales como para sujetos anómalos.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Tabla 2 Reproducibilidad intramuestral para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 (seis sujetos normales y cuatro sujetos anómalos) como porcentajes de linfocitos (convertidos)

Sujetos	Parámetro	Media (%)	DE[a] (entre tinciones)	df[b]	DE[a] (entre tinciones)	df[b]
Normales	Linfocitos T totales	72,7	0,845	12	0,858	15,6
	Linfocitos B totales	13,5	0,816	12	0,816	18,0
Anómalos	Linfocitos T totales	82,9	0,766	8	0,927	8,1
	Linfocitos B totales	8,81	0,559	8	0,662	8,4

a. DE = desviación estándar

b. df = grados de libertad

Reproducibilidad interinstrumental

En la tabla 3 se muestran los resultados de reproducibilidad interinstrumental.

Tabla 3 Reproducibilidad interinstrumental para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 (cinco sujetos normales y dos instrumentos) como porcentajes de linfocitos (convertidos)

Parámetro	Instrumento	Media	DE	CV[a]
Linfocitos T totales	1	68,2	0,77	1,13
	2	68,7	0,71	1,04
Linfocitos B totales	1	17,2	0,80	4,66
	2	17,8	0,88	4,97

a. CV = coeficiente de variación

Reproducibilidad entre laboratorios

La reproducibilidad entre laboratorios se indica mediante la capacidad para agrupar los intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 (tabla 1).

Reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 frente al método comparativo

En la tabla 4 se presenta un resumen de los resultados.

Estabilidad de las preparaciones celulares teñidas

Se recomienda analizar las muestras en las 24 horas siguientes a la tinción.

Reactividad cruzada

Los antígenos CD3 (Leu-4) y CD19 (Leu-12) no tienen reactividad cruzada conocida con elementos formados por células distintas de linfocitos en la sangre.

Linealidad-recuperación

Se espera que los resultados sean lineales de $3,5 \times 10^3$–$9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Tabla 4 Reactivo BD Simultest™ CD3/CD19 frente al método comparativo[a] (panel de reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte y panel de reactivos BD Simultest™ IMK Plus)

Parámetro	Pendiente	Intersección	r	n	Intervalo de datos (%)	
					IMK Plus	IMK-*Lymphocyte*
Linfocitos T totales	0,94	3,66	0,96	85	50–97	47–96
Linfocitos B totales	0,98	0,62	0,97	85	1–25	1–29

a. Estos datos se recopilaron en el BD FACScan™ utilizando reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte que incluían BD Leucogate™, Control γ_1/γ_{2a} y reactivos CD3/CD19. El software empleado fue el BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, de la familia de software BD Simulset™.

GARANTÍA

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

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

REFERENCIAS

1. Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut*. 1989;59:200-206.
2. Ohno T, Kanoh T, Suzuki T, et al. Comparative analysis of lymphocyte phenotypes between carriers of human immunodeficiency virus (HIV) and adult patients with primary immunodeficiency using two-color immunofluorescence flow cytometry. *Tohoku J Exp Med*. 1988;154:157-172.
3. Foucar K, Goeken JA. Clinical application of immunologic techniques to the diagnosis of lymphoproliferative and immunodeficiency disorders. *Lab Med*. 1982;13:403-413.
4. Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Defective suppressor cell function mediated by T8+ cell lines from patients with progressive multiple sclerosis. *J Immunol*. 1986;137:3436-3439.
5. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus. Correlation with clinical features. *Am J Med*. 1982;72:783-790.
6. Haynes BF. Summary of T-cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
7. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and T-cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med*. 1981;153:310-323.
8. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti–Leu-4 antibody. *J Immunol*. 1983;131:536-539.
9. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:259-288.
10. Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: Summary and Comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. Vol 2. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;3-43.

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 21 de 196

11. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood.* 1988;71:603-612.
12. Brenner MB, Groh V, Porcelli SA, et al. Structure and distribution of the human γ/δ T-cell receptor. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:1049-1053.
13. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol.* 1988;6:629-662.
14. Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD19. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:34-36.
15. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
16. Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html. Accessed March 12, 2019.
17. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document GP41-A6.
18. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
19. Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
20. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
21. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath.* 1991;60:190-208.
22. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol*. 1985;3:33-37.

PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

Para conocer las patentes de EE. UU. que pueden aplicarse, consulte bd.com/patents.

BD, el logotipo de BD, BD FACSFlow, BD FACStrak, BD Simulset, Calibrite, FACS, FACScan, Leucogate, Simultest y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company o de sus empresas afiliadas. Las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios. © 2023 BD. Todos los derechos reservados.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Glosario de símbolos

Remítase al etiquetado del producto para consultar los símbolos aplicables.

Símbolo	Significado
	Fabricante
EC REP	Representante autorizado en la Unión Europea
CH REP	Representante autorizado en Suiza
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
SN	Número de serie
STERILE	Estéril
STERILE A	Esterilizado utilizando técnicas de procesado asépticas
STERILE EO	Esterilizado utilizando óxido de etileno
STERILE R	Esterilizado utilizando radiación
STERILE	Esterilizado utilizando vapor de agua o calor seco
	No volver a esterilizar
	No estéril
	No utilizar si el envase está dañado y consúltense las *instrucciones de uso*
	Vía fluida estéril
	Vía fluida estéril (óxido de etileno)
	Vía fluida estéril (irradiación)
	Frágil, manejar con cuidado
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Manténgase seco
	Límite inferior de temperatura
	Límite superior de temperatura
	Límite de temperatura
	Limitación de humedad
	Riesgos biológicos
	No reutilizar
	Consúltense las *instrucciones de uso* o consúltense las *instrucciones de uso* electrónicas
	Precaución
LATEX	Contenido o presencia de látex de caucho natural
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
CONTROL -	Control negativo
CONTROL +	Control positivo
Σ	Contenido suficiente para <*n*> pruebas
	Sólo para la evaluación del funcionamiento en diagnóstico in vitro
	Apirógeno
#	Número de paciente
	Este lado hacia arriba
	No apilar

Símbolo	Significado
	Sistema de barrera estéril única
PHT DEHP BBP	Contenido o presencia de ftalato: combinación de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y butilbenciftalato (BBP)
	Recoger por separado Indica la recogida por separado obligatoria de los residuos de aparatos eléctricos y electrónicos.
CE	Marcado CE; significa que cumple con la especificación técnica europea
	Prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente
	Producto para autodiagnóstico
Rx Only	Esto solo se aplica a EE. UU.: «Precaución: La ley federal estadounidense impone restricciones sobre este dispositivo, cuya venta debe ser realizada por un médico o por orden de este».
CC	País de fabricación «CC» debe sustituirse por el código de país de dos o tres letras.
	Hora de recogida
	Cortar
	Despegar por aquí
	Fecha de recogida
	Manténgase fuera de la luz
H_2	Se produce gas de hidrógeno
	Perforación
	Número de secuencia del panel de inicio
	Número de secuencia del panel final
	Número de secuencia interno
/	<n.º de envase>/<total de envases>
MD	Producto sanitario
	Contiene sustancias peligrosas
	Marca de conformidad ucraniana
FC	Cumple los requisitos de la FCC conforme a 21 CFR, parte 15
c UL us	Certificación de producto UL para EE. UU. y Canadá
UDI	Identificador único de dispositivo
	Importador
	Colocar la etiqueta del paciente únicamente en el área enmarcada
MR	Compatible con la resonancia magnética (RM)
MR	Compatibilidad condicional con la resonancia magnética (RM)
MR	Incompatible con la resonancia magnética (RM)
For use with	Para uso con
This Product Contains Dry Natural Rubber	Este producto contiene goma natural seca
For Export Only	Solo para exportación
Instruments	Instrumentos

Nota: La disposición del texto en los símbolos viene determinada por el diseño de la etiqueta.

L006715(08) 2023-03

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
155 North McCarthy Boulevard
Milpitas, California 95035 USA

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Road
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Limited
14B George Bourke Drive
Mt. Wellington Auckland 1060
New Zealand

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite bdbiosciences.com.

ClinicalApplications@bd.com

eifu.bd.com

HISTORIAL

Revisión	Fecha	Cambios realizados
23-2609(04)	2023-08	Se ha actualizado la dirección legal del fabricante. Se ha actualizado el glosario de símbolos. Se ha añadido la sección «Historial». Se ha actualizado la sección «Patentes y marcas comerciales». Se ha añadido el símbolo «Rx Only» utilizado bajo prescripción. Se ha actualizado la sección «Reactivos y materiales necesarios pero no suministrados».

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

BD Simultest™ CD4/CD8

Para la determinación de células colaboradoras/inductoras y citotóxicas/supresoras humanas en sangre periférica

50 análisis, n.º de catálogo 340039

23-2615(04)
2023-08
Español

℞ Only IVD

1. USO PREVISTO

BD Simultest™ CD4/CD8 es un reactivo de inmunofluorescencia directa de dos colores que se utiliza para el recuento de porcentajes de linfocitos colaboradores/inductores ($CD4^+$) y supresores/citotóxicos ($CD8^+$) humanos maduros en sangre completa con eritrocitos lisados (LWB). También permite determinar la proporción de linfocitos colaboradores/supresores ($CD4^+/CD8^+$).

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los linfocitos humanos pueden dividirse en tres poblaciones principales basándose en su función biológica y en la expresión de antígenos de superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos citolíticos naturales (NK). Los linfocitos T participan en la inmunidad mediada por células específicas del antígeno y regulan la secreción de inmunoglobulina por los linfocitos B. Los linfocitos T se pueden clasificar también según sus propiedades funcionales como colaboradores/inductores y supresores/citotóxicos.

Aplicaciones clínicas

NOTA No en todos los estudios de esta sección se han utilizado reactivos de BD.

Los porcentajes de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ se utilizan para controlar el estado inmunológico de pacientes con enfermedades de inmunodeficiencia, enfermedades autoinmunitarias o reacciones inmunitarias. El porcentaje relativo de la subpoblación de $CD4^+$ es reducido y el porcentaje relativo de la subpoblación de $CD8^+$ es elevado en un gran número de pacientes con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas[1], como la inmunodeficiencia combinada grave (IDCG)[1] y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).[2]

NOTA Los Centers for Disease Control (CDC) recomiendan utilizar una combinación de reactivos de dos colores que contenga anticuerpos CD3 y CD8 para determinar el porcentaje de linfocitos T $CD8^+$ T lymphocytes, y una combinación de reactivos de dos colores que contenga anticuerpos CD3 y CD4 para determinar el porcentaje de linfocitos T $CD4^+$ en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).[3]

Un porcentaje de linfocitos T supresores/citotóxicos puede quedar fuera del intervalo de referencia normal en algunas enfermedades autoinmunitarias[4] y en determinadas reacciones inmunitarias, como la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) aguda,[5] y los rechazos de trasplantes.[6] El porcentaje relativo de la población de linfocitos $CD8^+$ con frecuencia puede disminuir en el lupus eritematoso sistémico (LES) activo, pero también puede aumentar en pacientes con LES sometidos a terapia con esteroides.[7]

La proporción de linfocitos T $CD4^+/CD8^+$ (colaboradores/supresores), cuantificada como la proporción de linfocitos CD4 positivos para FITC frente a los linfocitos CD8 positivos para PE, se ha utilizado para evaluar

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

el estado inmunológico de pacientes con un diagnóstico o sospecha de desarrollo de enfermedades autoinmunitarias[3,8] o inmunodeficiencias.[2,7] En muchos casos, los porcentajes relativos de linfocitos colaboradores se reducen y los linfocitos supresores aumentan en estados de inmunodeficiencia. Estos estados también pueden estar marcados por una linfopenia de células T.[9,10] Además, la proporción se ha utilizado para controlar la aparición de EICH aguda en pacientes sometidos a un trasplante de médula ósea.[5] Aunque se trata de un indicador útil, la proporción de linfocitos $CD4^+/CD8^+$ (colaboradores/supresores) tiene limitaciones específicas.

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se añaden reactivos de anticuerpos monoclonales a la sangre humana completa, los anticuerpos marcados con fluorocromo se unen específicamente a los antígenos de la superficie de los leucocitos. Los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse para identificar subpoblaciones de linfocitos.

Una muestra parcial (alícuota) del paciente teñida se introduce en el citómetro de flujo y pasa en una estrecha corriente a través del trayecto de un haz de láser. Las células teñidas emiten fluorescencia cuando las excita el haz del láser, y la luz emitida se recoge y procesa mediante el citómetro de flujo.

4. REACTIVO

Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis

El reactivo BD Simultest™ CD4/CD8 (suficiente para 50 análisis) se suministra en 1 ml de solución salina tamponada con gelatina y azida sódica al 0,1 %. Contiene CD4 marcado con FITC, clon SK3,[11,12] para identificar la población de linfocitos colaboradores/inductores, y CD8 marcado con PE, clon SK1,[10,11] para identificar la población de linfocitos supresores/citotóxicos. La relación fluoresceína-proteína (F:P) para los reactivos de anticuerpos monoclonales IgG de BD es de 2–5. La relación F:P para CD4 FITC se ha optimizado para su uso previsto.

El anticuerpo CD4 está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón. El anticuerpo CD4 reconoce el antígeno CD4, que interactúa con las moléculas de clase II del complejo de histocompatibilidad principal (CHP) y es el principal receptor del VIH.[13,14]

El anticuerpo CD8 está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón. El antígeno CD8 está presente en la subpoblación de linfocitos T supresores/citotóxicos humanos,[12,15] así como en una subpoblación de linfocitos citolíticos naturales (NK).[16] El antígeno CD8 se expresa como un complejo bimolecular unido por enlaces de disulfuro con una subunidad α de 32 kilodalton (kDa).[17] El dominio citoplásmico de la subunidad α del antígeno CD8 está asociado a la proteína tirosina quinasa $p56^{lck}$.[18,19]

Precauciones

- Para uso diagnóstico in vitro.
- Cuando se almacena a una temperatura de 2–8 °C, el reactivo de anticuerpo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No se debe utilizar después de la fecha de caducidad.
- El reactivo de anticuerpo no se debe congelar ni exponer a la luz directa durante el almacenamiento o la incubación con células. Mantenga seco el vial del reactivo.
- Cualquier alteración en el aspecto del reactivo, como la precipitación o decoloración, es un indicio de inestabilidad o deterioro. En ese caso, no utilice el reactivo.
- El reactivo de anticuerpo contiene azida sódica como conservante; sin embargo, es preciso extremar las precauciones para evitar la contaminación microbiana, que podría causar resultados erróneos.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

ADVERTENCIA Se consideran de riesgo biológico todas las muestras biológicas y todos los materiales que hayan entrado en contacto con ellas. Manipular como si pudieran transmitir alguna infección[20,21] y desechar tomando las precauciones adecuadas según la normativa federal, estatal y local. Nunca pipetee con la boca. Utilice ropa protectora, protección ocular y guantes adecuados.

Las concentraciones se muestran en la tabla siguiente:

Reactivo	Concentración (µg/ml)
CD4 FITC	1,5
CD8 PE	6,25

5. INSTRUMENTO

El reactivo BD Simultest™ CD4/CD8 está diseñado para utilizarse en un citómetro de flujo de BD que esté equipado con el hardware, el software y la electrónica de conmutación adecuados. El citómetro de flujo debe estar equipado para detectar fluorescencia de dos colores, dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC). Se recomienda utilizar el software BD Simulset™, versión 2.5 o posterior, para la adquisición y el análisis de datos.

Todas las características de rendimiento se obtuvieron con un citómetro de flujo BD FACScan™ y se verificaron en un citómetro de flujo BD FACStrak™. Otros sistemas pueden tener características distintas, por lo que deben ser verificados por el usuario.

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Extraiga sangre asépticamente por venopunción[22,23] utilizando un BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tube estéril. Para este procedimiento se necesita como mínimo 1 ml de sangre completa. Para obtener resultados óptimos, la sangre debe teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. La sangre con anticoagulante puede almacenarse a temperatura ambiente (20–25 °C) durante un máximo de 6 horas, hasta que esté lista para la tinción. Las muestras de sangre refrigeradas antes de la tinción pueden dar resultados anómalos.

Deben hacerse un hemograma de leucocitos y una fórmula leucocitaria a partir de la misma muestra de sangre completa antes de la tinción. Se considera aceptable un intervalo de concentración de leucocitos de $3,5 \times 10^3$–$9,8 \times 10^3$ leucocitos/µl. Las muestras con hemogramas superiores a $9,8 \times 10^3$ leucocitos/µl deben diluirse con una solución salina amortiguada con fosfato (PBS) 1X que contenga azida sódica al 0,1 %. Para muestras con recuentos inferiores a $3,5 \times 10^3$ leucocitos/µl podría ser necesaria más sangre, así como un procedimiento de separación para concentrar las células.

Condiciones que causan interferencias

No deben utilizarse muestras de pacientes previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre completa refrigeradas antes de la tinción pueden dar resultados anómalos. Para obtener resultados óptimos, las muestras de sangre deben teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. Las muestras obtenidas de pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores pueden ofrecer una escasa diferenciación.[24] La presencia de blastocitos o de eritrocitos no lisados o nucleados puede interferir en los resultados del análisis. Las muestras hemolizadas deben rechazarse. Siga las indicaciones del fabricante del tubo de recogida para conocer cuál es el volumen mínimo de sangre que se debe recoger.

PRECAUCIÓN Tome las precauciones habituales al recoger, manipular y desechar todas las muestras de sangre humana y reactivos potencialmente cancerígenos.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

7. PROCEDIMIENTO

Reactivo suministrado

Consulte Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis y Precauciones en la sección 4, Reactivo.

Reactivos y materiales necesarios pero no suministrados

- Reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (CD45/CD14), 1 ml (n.º de catálogo 340040). Para determinar el área de selección de los análisis de linfocitos, consulte las instrucciones de uso de BD Simultest™ Leucogate™ y el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™). Conserve a 2–8 °C.
- BD Simultest™ Control γ_1/γ_{2a} (IgG_1 FITC/IgG_{2a} PE) (ambos específicos de hemocianina de lapa californiana), 1 ml (n.º de catálogo: 340041). Conserve a 2–8 °C.
- BD FACS™ Lysing Solution (10X), 100 ml (n.º de catálogo 349202). Conserve a 2–25 °C. Para usarlo, diluya a 1:10 con agua apta para reactivos a temperatura ambiente (20–25 °C). Conserve en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente. La solución preparada se mantendrá estable durante un mes a temperatura ambiente. Consulte las instrucciones de uso de BD FACS™ Lysing Solution.
- BD Calibrite™ Beads (n.º de catálogo 349502). Para obtener información de uso detallada, consulte las instrucciones de uso de BD Calibrite™ Beads.
- BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tubes o equivalentes.
- Tubos de ensayo Falcon® desechables de poliestireno de 12 × 75 mm o equivalente.
- Agitador vorticial.
- Centrífuga de baja velocidad (velocidad mínima 200 *g*) con rotor de cesto giratorio y soportes para tubos de 12 × 75 mm.
- Aspirador de vacío con depósito.
- Micropipeta con puntas.
- Tampón de lavado de PBS con azida sódica al 0,1 %.
- Solución fijadora (solución de paraformaldehído [PFA] al 1 % en PBS 1X con azida sódica al 0,1 %).

  Almacene a una temperatura de 2–8 °C en un recipiente de vidrio ámbar durante un máximo de 1 semana.
- BD FACSFlow™ Sheath Fluid (n.º de catálogo 342003) o equivalente.

  PRECAUCIÓN Utilice únicamente diluyente BD FACSFlow™ Sheath Fluid para diluir BD Calibrite™ Beads.
- Agua apta para reactivos (destilada y desionizada).

Tinción y fijación de las células

Las muestras de sangre completa se tiñen primero con los reactivos BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y BD Simultest™ CD4/CD8 (tubo C). Después de la tinción, se utiliza BD FACS™ Lysing Solution diluida (1X) para lisar los eritrocitos. Evite exponer los tubos a la luz directa. Realice el procedimiento a temperatura ambiente (20–25 °C) utilizando reactivos a temperatura ambiente. Consulte Precauciones en la sección 4, Reactivo.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

1. Para cada muestra de paciente, etiquete tres tubos A, B y C de 12 × 75 mm. Además, etiquete cada tubo con el número de identificación de la muestra.
2. Coloque 20 µl de reactivo BD Simultest™ Leucogate™ en el tubo A, 20 µl de reactivo BD Simultest™ Control en el tubo B y 20 µl de reactivo BD Simultest™ CD4/CD8 en el tubo C.
3. Para cada tubo de muestra, utilice una punta de micropipeta nueva y añada con cuidado 100 µl de sangre completa con anticoagulante bien mezclada en el fondo de cada uno de los tres tubos etiquetados. La concentración de leucocitos recomendada es de $3,5 \times 10^3$–$9,8 \times 10^3$ leucocitos/µl. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 15–30 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

   NOTA Proteja las muestras de la luz directa durante este procedimiento de incubación y tenga cuidado para evitar que se vierta sangre por el lateral del tubo. Si queda sangre completa en el lateral del tubo, no se teñirá con el reactivo.
4. Añada 2 ml de BD FACS™ Lysing Solution 1X a temperatura ambiente (20–25 °C) en cada tubo. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 10–12 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (20–25 °C).
   No incube durante más de 12 minutos.

   NOTA Evite la exposición prolongada de las células a los reactivos líticos, ya que podría provocar la destrucción de leucocitos.
5. Inmediatamente después de la incubación, centrifugue los tubos a 300 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).
6. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.
7. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para volver a suspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 2 ml de PBS con azida sódica al 0,1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Centrifugue a 200 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).
8. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.
9. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para volver a suspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 0,5 ml de paraformaldehído al 1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Compruebe que las células estén bien mezcladas con la solución fijadora.
10. Las células ya están listas para analizarse en el citómetro de flujo. Tape o cubra los tubos preparados y almacénelos a una temperatura de 2–8 °C en un lugar oscuro hasta el momento del análisis por citometría de flujo. Analice las células fijadas en las 24 horas posteriores a la tinción. Agite a conciencia las células en el agitador vorticial a baja velocidad para reducir la agregación celular antes de realizar el análisis en el citómetro de flujo.[25]

Citometría de flujo

Siga las instrucciones de BD para el análisis por citometría de flujo bicolor.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Control de calidad

Para obtener resultados óptimos, se recomienda utilizar BD Calibrite™ Beads y el software BD FACSComp™ para configurar los voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT), ajustar la compensación de fluorescencia y verificar la sensibilidad del instrumento antes de usar el reactivo BD Simultest™ CD4/CD8 en un citómetro de flujo BD FACScan™.

Se recomienda analizar diariamente una muestra de control de un sujeto adulto normal para optimizar los parámetros del instrumento y como comprobación de control de calidad del sistema. En la figura 1 se muestran los resultados correctos para una muestra de un paciente normal desde el punto de vista hematológico.

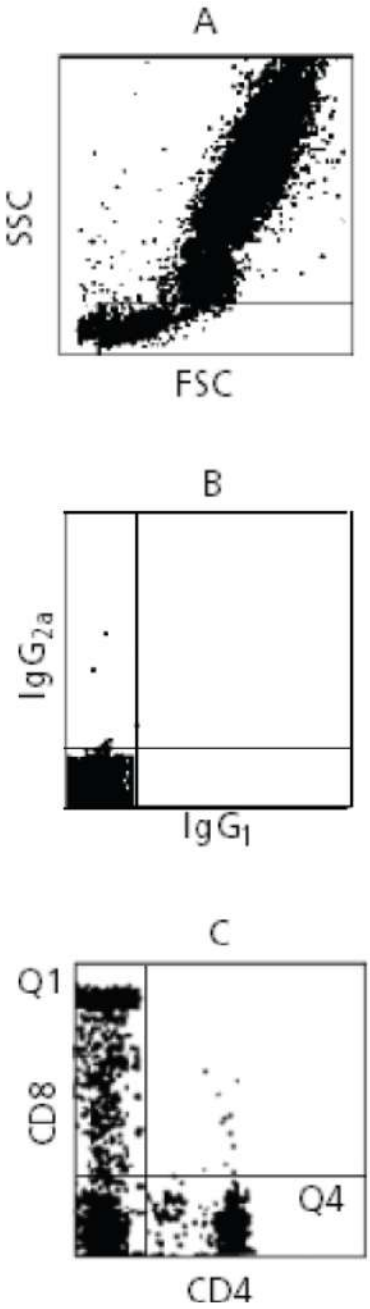
El reactivo BD Simultest™ Control se procesa con cada muestra de paciente para definir los marcadores de fluorescencia 1 (FL1) y fluorescencia 2 (FL2) entre grupos de linfocitos teñidos negativa y positivamente, así como para detectar la presencia de tinción inespecífica, que indicaría resultados erróneos del paciente.

Examine visualmente el gráfico de puntos correspondiente al tubo B del reactivo BD Simultest™ Control. Si el grupo negativo es difuso y está esparcido por el intervalo de intensidad de FL2, puede que el marcador no se haya ajustado correctamente y que los resultados no sean fiables.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Figura 1 Muestra de LWB de BD FACScan™, de un paciente hematológicamente normal, teñida con reactivos BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y BD Simultest™ CD4/CD8 (tubo C).



NOTA El reactivo BD Simultest™ Leucogate™ se utilizó para reducir los residuos, los monocitos y los granulocitos en el área de selección que se muestra para el tubo A. Se muestran gráficos de puntos de FL1 (eje X) frente a FL2 (eje Y) para los tubos B y C.

BRTEGAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

El software BD Simulset™ examinará automáticamente los datos y alertará al operador mediante una serie de posibles mensajes de error. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para obtener una lista con los posibles mensajes. Utilice los criterios siguientes para el examen de los gráficos de puntos obtenidos para cada muestra con el fin de evaluar la calidad de los datos obtenidos.

- El operador debe rechazar los resultados si recibe uno o más de los mensajes de error siguientes para el control normal: no separation between cellular populations (no hay separación entre poblaciones celulares); too few lymphocytes (less than 500) (linfocitos demasiado escasos [menos de 500]); excessive RBC or nucleated RBC contamination and debris (greater than 10%) (contaminación con eritrocitos excesivos o eritrocitos nucleados y residuos [superior al 10 %]); o excessive monocyte (greater than 3%) or granulocyte (greater than 6%) contamination of the lymphocyte gate (contaminación excesiva con monocitos [superior al 3 %] o granulocitos [superior al 6 %] del área de selección de linfocitos).
- Si no hay un motivo obvio para que falle el control normal, debe teñirse y procesarse una muestra de otro control normal y repetirse todo el procedimiento de tinción en todas las muestras siguientes.
- Las muestras con eritrocitos nucleados pueden contener un exceso de residuos debido a una lisis incompleta de estos con BD FACS™ Lysing Solution. El exceso de residuos puede suceder también cuando se analizan muestras de sangre de pacientes que padecen determinadas alteraciones hematológicas que dificultan la lisis de los eritrocitos, como mielofibrosis y esferocitosis. Los eritrocitos nucleados se contarán como residuos y, si estos superan el 10 %, el software marcará la muestra como «too many nonlymphs in gate» (demasiadas células distintas de linfocitos en el área de selección) y sus resultados deberán rechazarse.

8. RESULTADOS

Porcentaje de conversión de linfocitos

Cuando se realiza el cálculo del porcentaje de conversión de linfocitos, las subpoblaciones de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ se informa como un porcentaje de los linfocitos incluidos en el área de selección para análisis de linfocitos. Si no se realiza el cálculo, los resultados se indican como un porcentaje de los eventos del área de selección.

Fórmula leucocitaria en tres partes

Para la sangre completa lisada, es posible calcular los monocitos, los linfocitos y los granulocitos como un porcentaje de los leucocitos utilizando el reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A). El software BD Simulset™ calcula automáticamente una fórmula leucocitaria en tres partes. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para obtener impresiones de datos representativos.

NOTA La fórmula leucocitaria que proporciona el software BD Simulset™ se debe utilizar solo para compararla con un recuento independiente de fórmula leucocitaria con fines de control de calidad. No se debe utilizar como sustitución de un recuento de fórmula leucocitaria realizado por un laboratorio independiente en las historias clínicas de los pacientes ni se debe introducir en el software BD Simulset™ para obtener recuentos absolutos.

Recuentos absolutos

Puede calcularse un hemograma completo si se obtiene un hemograma de leucocitos y el porcentaje de linfocitos de una fórmula leucocitaria independiente mediante procedimientos de laboratorio estándar.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Para obtener instrucciones de cálculo de hemogramas completos, consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™).

9. LIMITACIONES

- Es necesario que los laboratorios definan sus propios intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD4/CD8 que puedan verse afectados por el sexo o la edad del paciente, así como la técnica utilizada en la preparación. La raza del paciente también puede influir, aunque aún no se dispone de suficientes datos para respaldar esta afirmación. Es necesario conocer la edad, el sexo, el estado clínico y la raza de los sujetos a la hora de determinar un intervalo de referencia.
- Los resultados del reactivo BD Simultest™ CD4/CD8 deben utilizarse junto con otra información obtenida de la evaluación clínica y procedimientos de diagnóstico independientes adicionales.
- El reactivo BD Simultest™ CD4/CD8 no está diseñado para la discriminación de muestras por la presencia de células leucémicas, ni para utilizarse en muestras fenotípicas de pacientes con leucemia. La presencia de blastocitos podría impedir que el reactivo BD Simultest™ Leucogate™ defina un área de selección de análisis de linfocitos adecuada. El software marcará la muestra y no se imprimirán los resultados.
- Los valores de recuento absoluto de las subpoblaciones de linfocitos podrían no ser comparables entre laboratorios debido a las variaciones en los métodos de determinación de recuentos de linfocitos, fórmulas leucocitarias, o ambos.

10. VALORES ESPERADOS

Subpoblaciones de leucocitos

La población de linfocitos colaboradores/inductores presente en el cuadrante 4 (C4) y la población de linfocitos supresores/citotóxicos presente en el cuadrante 1 (C1) del tubo C se muestran en la figura 1 y en el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™). Los resultados clínicamente significativos se encuentran en el informe del médico.

BD ha investigado los intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD4/CD8 en sujetos masculinos y femeninos normales mediante el citómetro de flujo BD FACScan™ en seis centros (cinco centros clínicos europeos y un centro de EE. UU.). Los intervalos de referencia normales previstos de linfocitos colaboradores/inductores y supresores/citotóxicos, así como la proporción de colaboradores/supresores para LWB, se muestran en la tabla 1.[26]

No se deben utilizar los intervalos de referencia para adultos con muestras de sangre de pacientes pediátricos.

La raza puede ser una variable en la definición de los intervalos de referencia normales,[27] aunque BD no ha recopilado datos suficientes para determinarlo.

NOTA Los valores normales previstos pueden variar según la edad, el sexo o la raza del paciente. Debido a estas diferencias, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia normal para cada parámetro.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Tabla 1 Intervalos de referencia representativos para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD4/CD8 en adultos hematológicamente normales como porcentajes de los linfocitos del área de selección totales (convertidos) (datos agrupados de seis centros clínicos)

Parámetro	Sexo	Edad	n	Media	Intervalo del 95 %[a]
Linfocitos Linfocitos T (%)	Masculino	18–40	77	39,9	27,3–52,5
	Masculino	41–70	84	43,9	28,5–59,2
	Femenino	18–40	85	44,0	31,4–56,7
	Femenino	41–70	85	48,9	34,0–63,8
Linfocitos T Linfocitos T (%)	Ambos	18–70	304	33,4	18,9–47,9
Proporción de colaboradores/supresores	Masculino	18–40	77	1,2	0,6–2,2
	Masculino	41–70	84	1,5	0,6–3,0
	Femenino	18–40	85	1,3	0,7–2,3
	Femenino	41–70	58	1,7	0,8–3,3

11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El rendimiento del reactivo BD Simultest™ CD4/CD8 se estableció mediante análisis en un centro clínicos de EE. UU. y en los laboratorios de BD Biosciences en San José, California.

Reproducibilidad intramuestral

En la tabla 2 se muestra la reproducibilidad intramuestral media obtenida para diez sujetos normales.

Reproducibilidad interinstrumental

En la tabla 3 se muestran los resultados de reproducibilidad interinstrumental.

Reproducibilidad entre laboratorios

La reproducibilidad entre laboratorios se indica mediante la capacidad para agrupar los intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD4 CD8 (tabla 1).

BD Simultest™ CD4/CD8 frente al método comparativo

En la tabla 4 se presenta un resumen de los resultados.

Tabla 2 Reproducibilidad intermuestral para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD4/CD8 (diez sujetos normales y tres instrumentos) expresada en porcentajes de linfocitos (convertidos)

Parámetro	Media (%)	DE[a]	CV[b]	df[c]
Linfocitos T colaboradores/inductores	45,8	1,26	2,47	20
Linfocitos T supresores/citotóxicos	39,0	1,37	3,28	20
Proporción de colaboradores/supresores	1,2	0,06	4,80	20

a. DE = desviación estándar

b. CV = coeficiente de variación

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15843
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

c. df = grados de libertad

Tabla 3 Reproducibilidad interinstrumental para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD4/CD8 (cinco sujetos normales y cinco sujetos anómalos) como porcentajes de linfocitos (convertidos)

Sujetos	n	Parámetro	Media	DE	CV	df
Normales	5	Linfocitos T colaboradores/inductores (%)	46,3	1,5	3,2	15
		Linfocitos T supresores/citotóxicos (%)	34,8	1,3	3,6	15
		Proporción de colaboradores/supresores	1,4	0,1	5,2	15
Anómalos	5	Linfocitos T colaboradores/inductores (%)	18,8	2,1	12,2	15
		Linfocitos T supresores/citotóxicos (%)	65,5	2,6	3,7	15
		Proporción de colaboradores/supresores	0,3	0,04	13,4	15

Tabla 4 Reactivo BD Simultest™ CD4/CD8 frente al método comparativo (BD Simultest™ Immune Monitoring kit [CD4/CD8]) con LWB y el citómetro de flujo BD FACScan

Parámetro	Pendiente	Intersección	r	n[a]	Intervalo de datos (%)
Linfocitos T colaboradores/inductores (%)	1,16	–1,81	0,96	31	10–60
Linfocitos T supresores/citotóxicos (%)	0,95	7,05	0,93	31	25–80
Proporción de colaboradores/supresores	1,02	–0,02	0,98	31	0,125–2,0

a. Compuesto por muestras normales y anómalas

Reactividad cruzada

El anticuerpo CD4 reacciona con los monocitos, así como con los linfocitos T colaboradores/inductores.[28] El anticuerpo CD8 reacciona con los linfocitos T supresores/citotóxicos y con una subpoblación de linfocitos citolíticos naturales (NK).[17]

Linealidad-recuperación

Se espera que los resultados sean lineales de $3,5 \times 10^3$–$9,8 \times 10^3$ leucocitos/µl.

Estabilidad de las preparaciones celulares teñidas

Se recomienda analizar las muestras en las 24 horas siguientes a la tinción.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

GARANTÍA

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

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

REFERENCIAS

1. Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut*. 1989;59:200-206.
2. Giorgi JV, Hultin LE. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clinical Immunology Newsletter*. 1990;10:55-61.
3. Centers for Disease Control. 1997 Revised guidelines for performing $CD4^+$ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR*. 1997;46:1-29.
4. Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Defective suppressor cell function mediated by T8+ cell lines from patients with progressive multiple sclerosis. *J Immunol*. 1986;137:3436-3439.
5. Gratama J, Naipal A, Oljans P, et al. T lymphocyte repopulation and differentiation after bone marrow transplantation. Early shifts in the ratio between T4+ and T8+ T lymphocytes correlate with the occurrence of acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1984;63:1416-1423.
6. Bishop G, Hall B, Duggin G, Horvath J, Sheil A, Tiller D. Immunopathology of renal allograft rejection analyzed with monoclonal antibodies to mononuclear cell markers. *Kidney Internat*. 1986;29:708-717.
7. Wolde-Mariam W, Peter J. Recent diagnostic advances in cellular immunology. *Diagnost Med*. 1984;7:25-32.
8. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus. Correlation with clinical features. *Am J Med*. 1982;72:783-790.
9. Ohno T, Kanoh T, Suzuki T, et al. Comparative analysis of lymphocyte phenotypes between carriers of human immunodeficiency virus (HIV) and adult patients with primary immunodeficiency using two-color immunofluorescence flow cytometry. *Tohoku J Exp Med*. 1988;154:157-172.
10. Stites DP, Casavant CH, McHugh TM, et al. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence. *Clin Immunol Immunopathol*. 1986;38:161-177.
11. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories: T2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leucocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:25-60.
12. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD, et al. Thymus-dependent membrane antigens in man: inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to T_{H2} antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:544-548.
13. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. 1986;47:333-348.
14. Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312:763-767.
15. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and T-cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med*. 1981;153:310-323.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

16. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol.* 1983;131:1789-1796.
17. Moebius U. Cluster report: CD8. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
18. Rudd CE, Burgess KE, Barber EK, Schlossman SF. Monoclonal antibodies to the CD4 and CD8 antigens precipitate variable amounts of CD4/CD8-associated $p56^{lck}$ activity. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:326-327.
19. Gallagher PF, Fazekas de St. Groth B, Miller JFAP. CD4 and CD8 molecules can physically associate with the same T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 1989;86:10044-10048.
20. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
21. Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html. Accessed March 12, 2019.
22. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document GP41-A6.
23. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry—Second Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
24. Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
25. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
26. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath.* 1991;60:190-208.
27. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol.* 1985;3:33-37.
28. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Anti–Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol.* 1983;131:212-216.

PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

Para conocer las patentes de EE. UU. que pueden aplicarse, consulte bd.com/patents.

BD, el logotipo de BD, BD FACSComp, BD FACSFlow, BD FACStrak, BD Simulset, Calibrite, FACS, FACScan, Leucogate, Simultest y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company o de sus empresas afiliadas. Las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios.
© 2023 BD. Todos los derechos reservados.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

Glosario de símbolos

Remítase al etiquetado del producto para consultar los símbolos aplicables.

Símbolo	Significado
	Fabricante
EC REP	Representante autorizado en la Unión Europea
CH REP	Representante autorizado en Suiza
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
SN	Número de serie
STERILE	Estéril
STERILE A	Esterilizado utilizando técnicas de procesado asépticas
STERILE EO	Esterilizado utilizando óxido de etileno
STERILE R	Esterilizado utilizando radiación
STERILE	Esterilizado utilizando vapor de agua o calor seco
	No volver a esterilizar
NON STERILE	No estéril
	No utilizar si el envase está dañado y consúltense las *instrucciones de uso*
STERILE	Vía fluida estéril
STERILE EO	Vía fluida estéril (óxido de etileno)
STERILE R	Vía fluida estéril (irradiación)
	Frágil, manejar con cuidado
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Manténgase seco
	Límite inferior de temperatura
	Límite superior de temperatura
	Límite de temperatura
%	Limitación de humedad
	Riesgos biológicos
	No reutilizar
	Consúltense las *instrucciones de uso* o consúltense las *instrucciones de uso* electrónicas
	Precaución
LATEX	Contenido o presencia de látex de caucho natural
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
CONTROL -	Control negativo
CONTROL +	Control positivo
Σ	Contenido suficiente para <*n*> pruebas
	Sólo para la evaluación del funcionamiento en diagnóstico in vitro
	Apirógeno
#	Número de paciente
	Este lado hacia arriba
	No apilar

Símbolo	Significado
	Sistema de barrera estéril única
PHT DEHP BBP	Contenido o presencia de ftalato: combinación de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y butilbencilftalato (BBP)
	Recoger por separado Indica la recogida por separado obligatoria de los residuos de aparatos eléctricos y electrónicos.
CE	Marcado CE; significa que cumple con la especificación técnica europea
	Prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente
	Producto para autodiagnóstico
Rx Only	Esto solo se aplica a EE. UU.: «Precaución: La ley federal estadounidense impone restricciones sobre este dispositivo, cuya venta debe ser realizada por un médico o por orden de este».
CC	País de fabricación «CC» debe sustituirse por el código de país de dos o tres letras.
	Hora de recogida
	Cortar
	Despegar por aquí
	Fecha de recogida
	Manténgase fuera de la luz
H_2	Se produce gas de hidrógeno
	Perforación
	Número de secuencia del panel de inicio
	Número de secuencia del panel final
	Número de secuencia interno
/	<n.º de envase>/<total de envases>
MD	Producto sanitario
	Contiene sustancias peligrosas
	Marca de conformidad ucraniana
FC	Cumple los requisitos de la FCC conforme a 21 CFR, parte 15
c UL us	Certificación de producto UL para EE. UU. y Canadá
UDI	Identificador único de dispositivo
	Importador
	Colocar la etiqueta del paciente únicamente en el área enmarcada
MR	Compatible con la resonancia magnética (RM)
MR	Compatibilidad condicional con la resonancia magnética (RM)
MR	Incompatible con la resonancia magnética (RM)
For use with	Para uso con
This Product Contains Dry Natural Rubber	Este producto contiene goma natural seca
For Export Only	Solo para exportación
Instruments	Instrumentos

Nota: La disposición del texto en los símbolos viene determinada por el diseño de la etiqueta.

L006715(08) 2023-03

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15843

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
155 North McCarthy Boulevard
Milpitas, California 95035 USA

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Road
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Limited
14B George Bourke Drive
Mt. Wellington Auckland 1060
New Zealand

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite bdbiosciences.com.

ClinicalApplications@bd.com

eifu.bd.com

HISTORIAL

Revisión	Fecha	Cambios realizados
23-2615(04)	2023-08	Se ha actualizado la dirección legal del fabricante. Se ha actualizado el glosario de símbolos. Se ha añadido la sección «Historial». Se ha actualizado la sección «Patentes y marcas comerciales». Se ha añadido el símbolo «Rx Only» utilizado bajo prescripción. Se ha actualizado la sección «Reactivos y materiales necesarios pero no suministrados».

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

BD Simultest™ Leucogate™ CD45/CD14

Para la definición del área de selección de linfocitos y el control de calidad en el inmunofenotipaje

50 análisis, n.º de catálogo 340040

23-2621(04)
2023-08
Español

℞ Only IVD

1. USO PREVISTO

BD Simultest™ Leucogate™ (CD45/CD14) es un reactivo de inmunofluorescencia directa de dos colores que permite establecer el área de selección de linfocitos óptima de linfocitos para el inmunofenotipaje de sangre completa con eritrocitos lisados (LWB). BD Simultest™ Leucogate™ está indicado para uso diagnóstico in vitro con reactivos de diagnóstico in vitro de BD. Para obtener información adicional, consulte las instrucciones de uso del paquete de diagnóstico in vitro de BD.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Para el inmunofenotipaje de linfocitos humanos mediante citometría de flujo se puede utilizar BD Leucogate™, un control negativo y uno o varios reactivos de anticuerpos monoclonales con antígenos de superficie celular de linfocitos. El reactivo BD Simultest™ Leucogate™ se utiliza para crear un área de selección de análisis de dispersión de la luz alrededor de los linfocitos. Es necesario definir un área de selección porque los reactivos de inmunofenotipaje de anticuerpos monoclonales pueden reaccionar no solo con linfocitos, sino también con células que no son linfocitos en preparaciones de LWB. BD Simultest™ Leucogate™ permite caracterizar y enumerar las células seleccionadas, lo que permite evaluar el control de calidad de los datos. Entre los componentes distintos de los linfocitos de LWB que pueden contaminar el área de selección para análisis de linfocitos se incluyen monocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y residuos (eritrocitos residuales, fantasmas de eritrocitos y trombocitos).[1]

NOTA Para obtener información adicional y una descripción general del inmunofenotipaje de linfocitos humanos, consulte las instrucciones de uso específicas del reactivo de inmunofenotipaje de diagnóstico in vitro de BD.

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se añaden reactivos de anticuerpos monoclonales a la sangre humana completa, los anticuerpos marcados con fluorocromo se unen específicamente a los antígenos de la superficie de los leucocitos. Los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse para identificar subpoblaciones de linfocitos.

Una muestra parcial (alícuota) del paciente teñida se introduce en el citómetro de flujo y pasa en una estrecha corriente a través del trayecto de un haz de láser. Las células teñidas emiten fluorescencia cuando las excita el haz del láser, y la luz emitida se recoge y procesa mediante el citómetro de flujo.

Se recomienda utilizar BD Simultest™ Leucogate™ junto con el software BD Simulset™ para establecer un área de selección de análisis de linfocitos que incluya un porcentaje igual o superior al 98 % de linfocitos maduros normales (no blastocitos) en la muestra. No obstante, si el área de selección contiene un porcentaje de monocitos superior al 3 %, el software reduce o ajusta automáticamente el área de selección

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 40 de 196

de dispersión de la luz para recoger un porcentaje igual o superior al 95 % de los linfocitos incluidos en la muestra.

El proceso mediante el cual se analizan los datos del tubo de BD Simultest™ Leucogate™ es un procedimiento de varias etapas (consulte la figura 1, la figura 2 y la figura 3). El procedimiento se realiza automáticamente con el software BD Simulset™, pero también se puede llevar a cabo manualmente con el software BD CONSORT™ 30 o BD LYSYS™ II (consulte la figura 1, la figura 2 y la figura 3 para definir manualmente las áreas de selección).

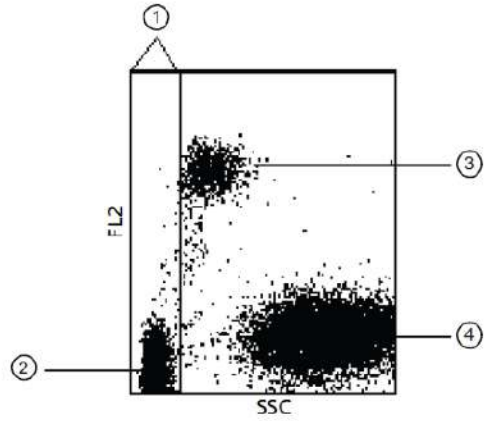
Para el control de calidad del área de selección de análisis de linfocitos es necesario que esta incluya un porcentaje igual o superior al 95 % de todos los linfocitos de la muestra. El software evalúa la eficiencia de la definición del área de selección determinando el número de linfocitos incluidos en esta en comparación con el total de linfocitos de la muestra.

También es posible determinar el porcentaje de todas las células contaminantes distintas de linfocitos identificables que se incluyen en el área de selección a efectos de control de calidad. Los porcentajes máximos permitidos de células distintas de linfocitos que se pueden incluir en el área de selección son un 3 % de monocitos, un 6 % de granulocitos y un 10 % de residuos. El software marcará todos aquellos valores que superen estos límites.

También se recomienda utilizar el reactivo BD Simultest™ Control γ_1/γ_{2a} (IgG_1 FITC/IgG_{2a} PE) y el software BD Simulset™ para definir los marcadores de fluorescencia 1 (FL1) y fluorescencia 2 (FL2) alrededor de la población de linfocitos negativos, así como para evaluar el grado de unión inespecífica de antígenos (tinción inespecífica) presente, especialmente aquella causada por receptores Fc.

La figura 1, la figura 2 y la figura 3 indican las etapas necesarias para establecer el área de selección de dispersión de la luz de linfocitos óptima.

Figura 1 Defina un área de selección alrededor de la población de linfocitos que exprese una baja dispersión lateral (SSC) y que sea negativa para CD14 PE. Registre las coordenadas X e Y para SSC.



ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Figura 2 Defina un área de selección alrededor de los leucocitos para excluir la mayoría de eventos de residuos. Registre las coordenadas X e Y para la dispersión frontal (FSC).

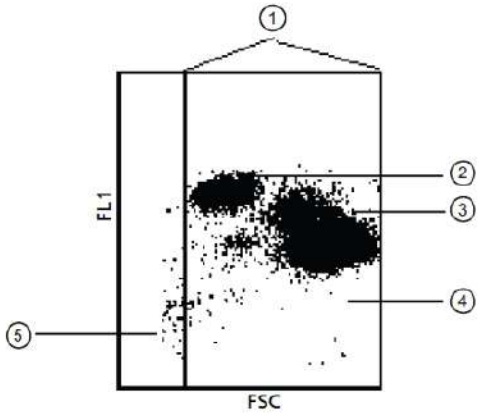
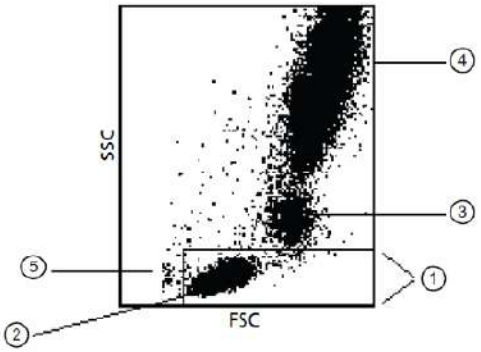


Figura 3 Utilice las coordenadas de FSC y SSC de la figura 1 y la figura 2 para establecer el área de selección de linfocitos óptima.



Leyenda de las figuras 1, 2 y 3

N.°	Descripción
1	Área de selección
2	Linfocitos
3	Monocitos
4	Granulocitos
5	Residuos

4. REACTIVOS

Reactivos suministrados, suficientes para 50 análisis

El reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (suficiente para 50 análisis) se suministra en 1 ml de solución salina tamponada con gelatina y azida sódica al 0,1 %. Contiene CD45 marcado con FITC (anti–HLe-1), clon 2D1,[2-4] para la identificación de leucocitos, y CD14 marcado con PE, clon MφP9,[5-7] para la identificación

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Apoderado
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

de monocitos. La relación fluoresceína-proteína (F:P) para los reactivos de anticuerpos monoclonales IgG de BD es de 2 a 5. La relación F:P para CD45 (anti–HLe-1) FITC se ha optimizado para su uso previsto.

El anticuerpo CD45 (Anti–HLe-1)[4] está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón. El antígeno CD45 está presente en todos los leucocitos humanos, incluidos linfocitos, monocitos, granulocitos, eosinófilos y basófilos de la sangre periférica, y desempeña un papel importante en la transducción de señales, al modificar las señales de otras moléculas de superficie.[8] El anticuerpo CD45 reconoce los antígenos de leucocitos humanos, de 180 a 220 kilodaltons (kDa), que pertenecen a la familia T200.[8]

El anticuerpo CD14 está compuesto por cadenas pesadas IgG_{2b} y cadenas ligeras kappa de ratón. CD14 reconoce el antígeno de monocito humano de 53 kDa.[9] El antígeno CD14 está presente en la mayoría de los monocitos de sangre periférica normal.[10]

Precauciones

- Para uso diagnóstico in vitro.
- Cuando se almacenan a una temperatura de 2–8 °C, los reactivos de anticuerpos se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No se debe utilizar después de la fecha de caducidad.
- El reactivo de anticuerpo no se debe congelar ni exponer a la luz directa durante el almacenamiento o la incubación con células. Mantenga seco el vial del reactivo.
- Cualquier alteración en el aspecto del reactivo, como la precipitación o decoloración, es un indicio de inestabilidad o deterioro. En ese caso, no utilice el reactivo.
- Los reactivos de anticuerpos contienen azida sódica como conservante; sin embargo, es preciso extremar las precauciones para evitar la contaminación microbiana, que podría causar resultados erróneos.

ADVERTENCIA Se consideran de riesgo biológico todas las muestras biológicas y todos los materiales que hayan entrado en contacto con ellas. Manipular como si pudieran transmitir alguna infección[11,12] y desechar tomando las precauciones adecuadas según la normativa federal, estatal y local. Nunca pipetee con la boca. Utilice ropa protectora, protección ocular y guantes adecuados.

Las concentraciones se muestran en la tabla siguiente:

Reactivo	Concentración (µg/ml)
CD45 FITC	25,0
CD14 PE	12,5

5. INSTRUMENTO

El reactivo BD Simultest™ Leucogate™ ha sido diseñado para utilizarse en un citómetro de flujo de BD que esté equipado con el hardware, el software y la electrónica de conmutación informáticos adecuados. El citómetro de flujo debe estar equipado para detectar fluorescencia bicolor, dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC). Se recomienda utilizar el software BD Simulset™, versión 2.5 o posteriores, para la adquisición y el análisis de datos.

Todas las características de rendimiento se obtuvieron con un citómetro de flujo BD FACScan™ y se verificaron en un citómetro de flujo BD FACStrak™. Otros sistemas pueden tener características distintas, por lo que deben ser verificados por el usuario.

ESTEBAN ZORZOLI Farmacéutico - M.N. 15643 CoDirector Técnico Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Extraiga la sangre de forma aséptica por venopunción[13,14] en un BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tube estéril o equivalente. Para este procedimiento se necesita como mínimo 1 ml de sangre completa. Para obtener resultados óptimos, la sangre debe teñirse en las 6 horas siguientes a la recogida. La sangre con anticoagulante puede almacenarse a temperatura ambiente (20–25 °C) durante un máximo de 6 horas, hasta que esté lista para la tinción. Las muestras de sangre refrigeradas antes de la tinción pueden dar resultados anómalos.

Deben hacerse un hemograma de leucocitos y una fórmula leucocitaria a partir de la misma muestra de sangre completa antes de la tinción. BD Simultest™ Leucogate™ puede utilizarse en muestras con hemogramas de leucocitos que estén dentro del intervalo aceptable de cualquier reactivo de diagnóstico in vitro de BD. Consulte las instrucciones de uso correspondientes del producto diagnóstico in vitro de BD para conocer el intervalo aceptable del reactivo de inmunofenotipaje. Para muestras con hemogramas inferiores al límite inferior, podría ser necesaria más sangre, así como un procedimiento de separación para concentrar las células. Para muestras con hemogramas superiores al límite superior del intervalo, podría ser necesario diluirlas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X que contenga acida sódica al 0,1 %.

Condiciones que causan interferencias

No deben utilizarse muestras de pacientes previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre completa refrigeradas antes de la tinción pueden dar resultados anómalos. Para obtener resultados óptimos, las muestras de sangre deben teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. Las muestras obtenidas de pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores pueden ofrecer una escasa diferenciación.[15] La presencia de blastocitos o de eritrocitos no lisados o nucleados puede interferir en los resultados del análisis. Las muestras hemolizadas deben rechazarse. Siga las indicaciones del fabricante del tubo de recogida para conocer cuál es el volumen mínimo de sangre que se debe recoger.

PRECAUCIÓN Tome las precauciones habituales al recoger, manipular y desechar todas las muestras de sangre humana y reactivos potencialmente cancerígenos.

7. PROCEDIMIENTO

Reactivos suministrados

Consulte Reactivos suministrados, suficientes para 50 análisis y Precauciones en la sección 4, Reactivos.

Reactivos y materiales necesarios que no se suministran

- BD Simultest™ Control.
- Reactivo de inmunofenotipaje apropiado.
- BD FACS™ Lysing Solution (10X), 100 ml (n.º de catálogo 349202). Conserve a 2–25 °C. Para usarlo, diluya a 1:10 con agua apta para reactivos a temperatura ambiente (20–25 °C). Conserve en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente. La solución preparada se mantendrá estable durante un mes a temperatura ambiente. Consulte las instrucciones de uso de BD FACS™ Lysing Solution.
- BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tubes o equivalentes.
- BD Calibrite™ Beads (n.º de catálogo 349502). Para obtener información de uso detallada, consulte las instrucciones de uso.
- Tubos de ensayo Falcon® desechables de poliestireno de 12 × 75 mm o equivalente.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

- Agitador vorticial.
- Centrifugadora de baja velocidad (200 *g*) con rotor de cesto giratorio y soportes para tubos de 12 × 75 mm.
- Aspirador de vacío con depósito.
- Micropipeta con puntas.
- Tampón de lavado de PBS con azida sódica al 0,1 %.
- Solución fijadora (solución de paraformaldehído [PFA] al 1 % en PBS 1X con azida sódica al 0,1 %).

  Almacene a una temperatura de 2–8 °C en un recipiente de vidrio ámbar durante un máximo de 1 semana.
- BD FACSFlow™ Sheath Fluid (n.º de catálogo 342003) o equivalente.

  PRECAUCIÓN Utilice únicamente diluyente BD FACSFlow™ Sheath Fluid para diluir BD Calibrite™ Beads.
- Agua apta para reactivos (destilada y desionizada).

Tinción y fijación de las células

Las muestras de sangre completa se tiñen primero con los reactivos BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y el reactivo de inmunofenotipaje de linfocitos de BD apropiado (tubo C). Después de la tinción, se utiliza BD FACS™ Lysing Solution diluida (1X) para lisar los eritrocitos. Evite exponer los tubos a la luz directa. Realice el procedimiento a temperatura ambiente (20–25 °C) utilizando reactivos a temperatura ambiente. Consulte Precauciones en la sección 4, Reactivos.

1. Para cada muestra de paciente, etiquete tres tubos de 12 x 75 mm, A, B y C. Si hay otros reactivos en el panel, etiquete más tubos según sea necesario. Etiquete cada tubo también con el número de identificación de la muestra.
2. Ponga 20 µl de reactivo BD Simultest™ Leucogate™ en el tubo A, 20 µl de BD Simultest™ Control en el tubo B, 20 µl del reactivo de inmunofenotipaje apropiado en el tubo C y 20 µl de cada reactivo de inmunofenotipaje adicional del panel en tubos separados, según sea necesario.
3. Para cada tubo de muestra del paciente, utilice una punta de micropipeta nueva y añada con cuidado 100 µl de la muestra de sangre completa del paciente con anticoagulante y bien mezclada a la concentración correcta en el fondo de cada uno de los tubos etiquetados. Tenga cuidado para evitar que se vierta sangre por el lateral del tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente.

   NOTA Proteja las muestras de la luz directa durante este procedimiento de incubación y tenga cuidado para evitar que se vierta sangre por el lateral del tubo. Si queda sangre completa en la pared del tubo, puede que no se tiña con el reactivo.
4. Añada 2 ml de BD FACS™ Lysing Solution 1X a temperatura ambiente en cada tubo. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 10 a 12 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente. No incube durante más de 12 minutos.

   NOTA Evite la exposición prolongada de las células a los reactivos líticos, ya que podría provocar la destrucción de leucocitos.
5. Inmediatamente después de la incubación, centrifugue los tubos a 300 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

6. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.
7. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para resuspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 2 ml de PBS con azida sódica al 0,1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Centrifugue a 200 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.
9. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para resuspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 0,5 ml de paraformaldehído al 1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Compruebe que las células estén bien mezcladas con la solución fijadora.
10. Las células ya están listas para analizarse en el citómetro de flujo. Tape o cubra los tubos preparados y consérvelos a 2–8 °C, al abrigo de la luz, hasta que se pueda realizar el análisis por citometría de flujo. Analice las células fijadas en las 24 horas posteriores a la tinción. Agite a conciencia las células en el agitador vorticial (a baja velocidad) para reducir la agregación celular antes de realizar el análisis en el citómetro de flujo.[15]

Citometría de flujo

Siga las instrucciones de BD para el análisis por citometría de flujo bicolor.

Para obtener información sobre los tubos B y C, consulte las instrucciones de uso del reactivo apropiado.

Control de calidad

Para obtener resultados óptimos, se recomienda utilizar BD Calibrite™ Beads y el software BD FACSComp™ para configurar los voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT), ajustar la compensación de fluorescencia y verificar la sensibilidad del instrumento antes de usar los reactivos BD Simultest™ en un citómetro de flujo BD FACScan™.

Se recomienda analizar diariamente una muestra de control de un sujeto adulto normal para optimizar los parámetros del instrumento y como comprobación de control de calidad del sistema. En la figura 1, la figura 2 y la figura 3 se muestran los resultados correctos para una muestra de un paciente normal desde el punto de vista hematológico.

El software BD Simulset™ examinará automáticamente los datos y alertará al operador mediante una serie de posibles mensajes de error. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para obtener una lista con los posibles mensajes. El software utiliza los criterios siguientes para el examen de los gráficos de puntos obtenidos para cada muestra a fin de evaluar la calidad de los datos obtenidos.

- El operador debe rechazar los resultados si recibe uno o varios de los mensajes de error siguientes para el control normal: no separation between cellular populations (no hay separación entre poblaciones celulares); too few lymphocytes (less than 500) (linfocitos demasiado escasos [menos de 500]); excessive RBC or nucleated RBC contamination and debris (greater than 10%) (contaminación con eritrocitos excesivos o eritrocitos nucleados y residuos [superior al 10 %]); o excessive monocyte (greater than 3%) or granulocyte (greater than 6%) contamination of the lymphocyte gate (contaminación excesiva con monocitos [superior al 3 %] o granulocitos [superior al 6 %] del área de selección de linfocitos).

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

- Si no hay un motivo obvio para que falle el control normal, debe volver a teñirse y procesarse una muestra de otro control normal y repetirse todo el procedimiento de tinción en todas las muestras siguientes.
- Las muestras con eritrocitos nucleados pueden contener un exceso de residuos debido a una lisis incompleta de estos con BD FACS™ Lysing Solution. El exceso de residuos puede suceder también cuando se analizan muestras de sangre de pacientes que padecen determinadas alteraciones hematológicas que dificultan la lisis de los eritrocitos (por ejemplo, mielofibrosis y esferocitosis). Los eritrocitos nucleados se contarán como residuos y, si estos superan el 10 %, el software marcará la muestra como con "demasiadas células distintas de linfocitos en el área de selección" y sus resultados deberán rechazarse.

8. RESULTADOS

Porcentaje de conversión de linfocitos

Cuando se realiza el cálculo del porcentaje de conversión de linfocitos, la subpoblación de linfocitos para el reactivo de inmunofenotipaje de diagnóstico in vitro se trata como porcentaje de los linfocitos incluidos en el área de selección para el análisis de linfocitos. Si no se realiza el cálculo, los resultados se indican como un porcentaje de los eventos del área de selección.

9. LIMITACIONES

Fórmula leucocitaria en tres partes

Para la sangre completa lisada, es posible calcular los monocitos, los linfocitos y los granulocitos como un porcentaje de los leucocitos utilizando el reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A). El software BD Simulset™ calcula automáticamente una fórmula leucocitaria en tres partes. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para obtener impresiones de datos representativos.

NOTA No utilice la fórmula leucocitaria del informe del software BD Simulset™ para calcular hemogramas completos. La fórmula leucocitaria proporcionada por el software BD Simulset™ se imprime solamente para realizar una comparación con los resultados procedentes de la fórmula leucocitaria realizada por un laboratorio independiente con fines de control de calidad y no debe sustituir a la fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente de historias clínicas de pacientes ni introducirse en el software BD Simulset™ para obtener un hemograma completo.

- Una variación en la configuración del área de selección de linfocitos manual o automática cambiará las cantidades relativas de las subpoblaciones analizadas. El software BD Simulset™ utiliza el tubo de BD Leucogate™ para incluir al menos el 95 % de los linfocitos totales en la muestra a fin de definir el área de selección para análisis de linfocitos y exige un examen visual del área para la validación.
- El reactivo BD Simultest™ Leucogate™ no está diseñado para la discriminación de muestras por la presencia de células leucémicas ni para utilizarse en muestras fenotípicas de pacientes con leucemia. La presencia de blastocitos podría impedir que el reactivo BD Leucogate™ defina un área de selección de análisis de linfocitos adecuada. El software marcará la muestra y no se imprimirán los resultados.
- La capacidad del citómetro de flujo para seleccionar linfocitos y eliminar trombocitos, eritrocitos, residuos, granulocitos y monocitos del área de selección de linfocitos depende de la existencia de una clara demarcación entre estos elementos y los linfocitos en una visualización de FSC frente a SSC. Para algunos pacientes, esta demarcación no está clara, por lo que la definición del área de selección de linfocitos será menos efectiva.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

10. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Para ver los datos de rendimiento del inmunofenotipaje de linfocitos mediante BD Simultest™ Leucogate™ y otros reactivos de inmunofenotipaje de BD, consulte las instrucciones de uso del reactivo correspondiente.

Reactividad cruzada

CD14 reacciona débilmente con los granulocitos, así como con los monocitos/macrófagos.[17] Se ha observado que el anticuerpo CD45 reacciona débilmente con eritrocitos y trombocitos circulantes maduros.[8,18]

Linealidad-recuperación

La linealidad de respuesta en un amplio intervalo de leucocitos se determina para cada reactivo de inmunofenotipaje de diagnóstico in vitro de BD utilizando BD Leucogate™ en el procedimiento de ensayo. Consulte las instrucciones de uso del reactivo de BD apropiado para conocer el intervalo aceptable de leucocitos.

GARANTÍA

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

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

REFERENCIAS

1. Loken M, Brosnan J, Bach B, Ault K. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. *Cytometry*. 1990;11:453-459.
2. Beverley P. Production and use of monoclonal antibodies in transplantation immunology. In: Touraine J, Trager J, Betuel H, eds.*Transplantation and Clinical Immunology XI*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1980:87-94.
3. Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds.*Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
4. Rowe D, Beverley P. Characterisation of breast cancer infiltrates using monoclonal antibodies to human leucocyte antigens.*Br J Cancer*. 1984;49:149-159.
5. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the first international Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories: M2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds.*Leucocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:82-108.
6. Dimitriu-Bona A, Burmester GR, Waters SJ, Winchester RJ. Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies*J Immunol*. 1983;130:145-152.
7. Herrmann F, Komischke B, Odenwald E, Ludwig WD. Use of monoclonal antibodies as a diagnostic tool in human leukemia. I. Acute myeloid leukemia and acute phase of chronic myeloid leukemia.*Blut*. 1983;47:157-163.
8. Schwinzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15640
Apoderado

9. Goyert S, Tesio L, Ashman L, et al. Report on the CD14 Cluster Workshop. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:789-794.
10. Bernstein ID, Self S. Joint report of the myeloid section of the Second International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human Myeloid and Hematopoietic Cells*. Vol 3. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:1-25.
11. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
12. Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html. Accessed March 12, 2019.
13. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document GP41-A6.
14. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
15. Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
16. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
17. Jayaram Y, Hogg N. Surface expression of CD14 molecules on human neutrophils. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:796-797.
18. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10:43-55.

PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

Para conocer las patentes de EE. UU. que pueden aplicarse, consulte bd.com/patents.

BD, el logotipo de BD, BD CONSORT, BD FACSComp, BD FACSFlow, BD FACStrak, BD LYSYS, BD Simulset, Calibrite, FACS, FACScan, Leucogate, Simultest y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company o de sus empresas afiliadas. Las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios. © 2023 BD. Todos los derechos reservados.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

Glosario de símbolos

Remítase al etiquetado del producto para consultar los símbolos aplicables.

Símbolo	Significado
	Fabricante
EC REP	Representante autorizado en la Unión Europea
CH REP	Representante autorizado en Suiza
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
SN	Número de serie
STERILE	Estéril
STERILE A	Esterilizado utilizando técnicas de procesado asépticas
STERILE EO	Esterilizado utilizando óxido de etileno
STERILE R	Esterilizado utilizando radiación
STERILE	Esterilizado utilizando vapor de agua o calor seco
	No volver a esterilizar
NON STERILE	No estéril
	No utilizar si el envase está dañado y consúltense las *instrucciones de uso*
STERILE	Vía fluida estéril
STERILE EO	Vía fluida estéril (óxido de etileno)
STERILE R	Vía fluida estéril (irradiación)
	Frágil, manejar con cuidado
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Manténgase seco
	Límite inferior de temperatura
	Límite superior de temperatura
	Límite de temperatura
%	Limitación de humedad
	Riesgos biológicos
	No reutilizar
	Consúltense las *instrucciones de uso* o consúltense las *instrucciones de uso* electrónicas
	Precaución
LATEX	Contenido o presencia de látex de caucho natural
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
CONTROL -	Control negativo
CONTROL +	Control positivo
Σ	Contenido suficiente para <*n*> pruebas
	Sólo para la evaluación del funcionamiento en diagnóstico in vitro
	Apirógeno
#	Número de paciente
	Este lado hacia arriba
	No apilar

Símbolo	Significado
	Sistema de barrera estéril única
PHT DEHP BBP	Contenido o presencia de ftalato: combinación de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y butilbenciftalato (BBP)
	Recoger por separado Indica la recogida por separado obligatoria de los residuos de aparatos eléctricos y electrónicos.
CE	Marcado CE; significa que cumple con la especificación técnica europea
	Prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente
	Producto para autodiagnóstico
Rx Only	Esto solo se aplica a EE. UU.: «Precaución: La ley federal estadounidense impone restricciones sobre este dispositivo, cuya venta debe ser realizada por un médico o por orden de este».
CC	País de fabricación «CC» debe sustituirse por el código de país de dos o tres letras.
	Hora de recogida
	Cortar
	Despegar por aquí
	Fecha de recogida
	Manténgase fuera de la luz
H_2	Se produce gas de hidrógeno
	Perforación
	Número de secuencia del panel de inicio
	Número de secuencia del panel final
	Número de secuencia interno
/	<n.º de envase>/<total de envases>
MD	Producto sanitario
	Contiene sustancias peligrosas
	Marca de conformidad ucraniana
FC	Cumple los requisitos de la FCC conforme a 21 CFR, parte 15
c UL us	Certificación de producto UL para EE. UU. y Canadá
UDI	Identificador único de dispositivo
	Importador
	Colocar la etiqueta del paciente únicamente en el área enmarcada
MR	Compatible con la resonancia magnética (RM)
MR	Compatibilidad condicional con la resonancia magnética (RM)
MR	Incompatible con la resonancia magnética (RM)
For use with	Para uso con
This Product Contains Dry Natural Rubber	Este producto contiene goma natural seca
For Export Only	Solo para exportación
Instruments	Instrumentos

Nota: La disposición del texto en los símbolos viene determinada por el diseño de la etiqueta.

L006715(08) 2023-03

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico
Gerente Técnico

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
155 North McCarthy Boulevard
Milpitas, California 95035 USA

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Road
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Limited
14B George Bourke Drive
Mt. Wellington Auckland 1060
New Zealand

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite bdbiosciences.com.

ClinicalApplications@bd.com

eifu.bd.com

HISTORIAL

Revisión	Fecha	Cambios realizados
23-2621(04)	2023-08	Se ha actualizado la dirección legal del fabricante. Se ha actualizado el glosario de símbolos. Se ha añadido la sección «Historial». Se ha actualizado la sección «Patentes y marcas comerciales». Se ha añadido el símbolo «Rx Only» utilizado bajo prescripción. Se ha actualizado la sección «Reactivos y materiales necesarios que no se suministran».

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

BD Simultest™ CD3/CD4

Para la determinación de porcentajes de linfocitos T colaboradores/inductores humanos en sangre periférica

50 análisis, n.º de catálogo 340043

23-2639(04)
2023-08
Español

℞ Only IVD

1. USO PREVISTO

BD Simultest™ CD3/CD4 (Leu-4/3a) es un reactivo de inmunofluorescencia directa de dos colores que se utiliza para enumerar porcentajes de linfocitos T colaboradores/inductores humanos maduros en sangre completa con eritrocitos lisados (LWB).

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los linfocitos humanos pueden dividirse en tres poblaciones principales según su función biológica y en la expresión de antígenos de superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos citolíticos naturales (NK). Los linfocitos T participan en la inmunidad mediada por células específicas del antígeno y regulan la secreción de inmunoglobulina por los linfocitos B. Los linfocitos T se pueden clasificar también según sus propiedades funcionales como colaboradores/inductores y supresores/citotóxicos.

Aplicaciones clínicas

NOTA No en todos los estudios de esta sección se han empleado reactivos de BD.

Los linfocitos T colaboradores/inductores son una subpoblación de linfocitos T ($CD3^+$) que son $CD4^+$. Los porcentajes de linfocitos-T colaboradores/inductores ($CD3^+CD4^+$) se pueden utilizar para caracterizar y controlar algunas formas de enfermedades de inmunodeficiencia[1-3] y autoinmunitarias.[4,5] La determinación de los porcentajes de linfocitos T colaboradores/inductores puede ser útil para el control de individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).[6] (Los Centros para el Control de enfermedades [«Centers for Disease Control», CDC] recomiendan utilizar una combinación de reactivos de dos colores que contenga anticuerpos CD3 y CD4 para determinar el porcentaje de linfocitos T CD4+ en pacientes infectados por el virus del VIH.)[7] Estos pacientes suelen presentar una disminución constante en los linfocitos T colaboradores/inductores a medida que avanza la infección.[8]

NOTA El reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 permite identificar y enumerar los linfocitos T colaboradores/inductores por separado de los monocitos $CD3^-CD4^+$ contaminantes.[7]

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se añaden reactivos de anticuerpos monoclonales a la sangre humana completa, los anticuerpos marcados con fluorocromo se unen específicamente a los antígenos de la superficie de los leucocitos. Los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse para identificar subpoblaciones de linfocitos.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Una muestra parcial (alícuota) del paciente teñida se introduce en el citómetro de flujo y pasa en una estrecha corriente a través del trayecto de un haz de láser. Las células teñidas emiten fluorescencia cuando las excita el haz del láser, y la luz emitida se recoge y procesa mediante el citómetro de flujo.

4. REACTIVO

Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis

El reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 (suficiente para 50 análisis) se suministra en 1 ml de solución salina tamponada con gelatina y azida sódica al 0,1 %. Contiene CD3 marcado con FITC (Leu-4), clon SK7,[9-12] y CD4 marcado con PE (Leu-3a), clon SK3,[13,14] para identificar la población de linfocitos T colaboradores/inductores ($CD3^+CD4^+$). La relación fluoresceína-proteína (F:P) para los reactivos de anticuerpos monoclonales IgG de BD es de 2 a 5. La relación F:P para CD3 (Leu-4) FITC se ha optimizado para su uso previsto.

El anticuerpo CD3 (Leu-4) está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 de ratón y cadenas ligeras kappa. CD3 reacciona con la cadena épsilon del complejo CD3/receptor del antígeno de células T (TCR).[15] Este complejo está formado por al menos seis proteínas, con pesos moleculares entre 20 y 30 kilodaltons (kDa).[16] El antígeno reconocido por anticuerpos CD3 se asocia de forma no covalente a TCR α/β o γ/δ (70–90 kDa).[17]

El anticuerpo CD4 (Leu-3a) está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 de ratón y cadenas ligeras kappa. El anticuerpo CD4 reconoce el antígeno CD4, que interactúa con las moléculas de clase II del complejo de histocompatibilidad principal (CHP) y es el principal receptor del VIH.[18,19]

Precauciones

- Para uso diagnóstico in vitro.
- Cuando se almacena a una temperatura de 2–8 °C, el reactivo de anticuerpo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No se debe utilizar después de la fecha de caducidad.
- El reactivo de anticuerpo no se debe congelar ni exponer a la luz directa durante el almacenamiento o la incubación con células. Mantenga seco el vial del reactivo.
- Cualquier alteración en el aspecto del reactivo, como la precipitación o decoloración, es un indicio de inestabilidad o deterioro. En ese caso, no utilice el reactivo.
- El reactivo del anticuerpo contiene azida sódica como conservante. Sin embargo, es preciso extremar las precauciones para evitar la contaminación microbiana, que podría causar resultados erróneos.

ADVERTENCIA Se consideran de riesgo biológico todas las muestras biológicas y todos los materiales que hayan entrado en contacto con ellas. Manipular como si pudieran transmitir alguna infección[20,21] y desechar tomando las precauciones adecuadas según la normativa federal, estatal y local. Nunca pipetee con la boca. Utilice ropa protectora, protección ocular y guantes adecuados.

Las concentraciones se muestran en la tabla siguiente:

Reactivo	Concentración (µg/ml)
CD3 FITC	25,0
CD4 PE	1,5

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

5. INSTRUMENTO

El reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 está diseñado para utilizarse en un citómetro de flujo de BD que esté equipado con el hardware, el software y la electrónica de conmutación adecuados. El citómetro de flujo debe estar equipado para detectar fluorescencia de dos colores, dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC). Se recomienda utilizar el software BD Simulset™, versión 2.5 o posteriores, para la adquisición y el análisis de datos.

Todas las características de rendimiento se obtuvieron con un citómetro de flujo BD FACScan™ y se verificaron en un citómetro de flujo BD FACStrak™. Es posible que los demás sistemas tengan características distintas, por lo que el usuario deberá verificarlos.

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Extraiga la sangre de forma aséptica por venopunción[22,23] en un BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tube estéril o equivalente. Para este procedimiento se necesita como mínimo 1 ml de sangre completa. Para obtener resultados óptimos, la sangre debe teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. La sangre con anticoagulante puede almacenarse a temperatura ambiente (20–25 °C) durante un máximo de 6 horas, hasta que esté lista para la tinción. Las muestras de sangre que se refrigeren antes de la tinción pueden arrojar resultados anómalos.

Deben hacerse un recuento de leucocitos y una fórmula leucocitaria a partir de la misma muestra de sangre completa antes de la tinción. Se considera aceptable un intervalo de concentración de leucocitos de $3,5 \times 10^3$ a $9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl. Las muestras con hemogramas superiores a $9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl deben diluirse con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X que contenga acida sódica al 0,1 %. Para muestras con recuentos inferiores a $3,5 \times 10^3$ leucocitos/µl podría ser necesaria más sangre, así como un procedimiento de separación para concentrar las células.

Condiciones que causan interferencias

No deben utilizarse muestras de pacientes previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre completa que se refrigeren antes de la tinción pueden arrojar resultados anómalos. Para obtener resultados óptimos, las muestras de sangre deben teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. Las muestras obtenidas de pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores pueden ofrecer una escasa diferenciación.[24] La presencia de blastocitos o de eritrocitos no lisados o nucleados puede interferir en los resultados del análisis. Las muestras hemolizadas deben rechazarse. Siga las indicaciones del fabricante del tubo de recogida para conocer cuál es el volumen mínimo de sangre que se debe recoger.

PRECAUCIÓN Tome las precauciones habituales al recoger, manipular y desechar todas las muestras de sangre humana y reactivos potencialmente cancerígenos.

7. PROCEDIMIENTO

Reactivo suministrado

Consulte Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis y Precauciones en la sección 4, Reactivo.

Reactivos y materiales necesarios que no se suministran

- Reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (CD45/CD14), 1 ml (n.º de catálogo 340040). Para determinar el área de selección de los análisis de linfocitos, consulte las instrucciones de uso de BD Simultest™ Leucogate™ y el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™). Conserve a 2–8 °C.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

- BD Simultest™ Control γ_1/γ_{2a} (IgG_1 FITC/IgG_{2a} PE) (ambos específicos de hemocianina de lapa californiana), 1 ml (n.º de catálogo: 340041). Conserve a 2–8 °C.
- BD FACS™ Lysing Solution (10X), 100 ml (n.º de catálogo 349202). Conserve a 2–25 °C. Para usarlo, diluya a 1:10 con agua apta para reactivos a temperatura ambiente (20–25 °C). Conserve en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente. La solución preparada se mantendrá estable durante un mes a temperatura ambiente. Consulte las instrucciones de uso de BD FACS™ Lysing Solution.
- BD Calibrite™ Beads (n.º de catálogo 349502). Para obtener información de uso detallada, consulte las instrucciones de uso de BD Calibrite™ Beads.
- BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tubes o equivalentes.
- Tubos de ensayo Falcon® desechables de poliestireno de 12 × 75 mm o equivalente.
- Agitador vorticial.
- Centrifugadora de baja velocidad (velocidad mínima 200 *g*) con rotor de cesto giratorio y soportes para tubos de 12 × 75-mm.
- Aspirador de vacío con depósito.
- Micropipeta con puntas.
- Tampón de lavado de PBS con azida sódica al 0,1 %.
- Solución fijadora (solución de paraformaldehído [PFA] al 1 % en PBS 1X con azida sódica al 0,1 %).

  Almacene a una temperatura de 2–8 °C en un recipiente de vidrio ámbar durante un máximo de 1 semana.
- BD FACSFlow™ Sheath Fluid (n.º de catálogo 342003) o equivalente.

  PRECAUCIÓN Utilice únicamente diluyente BD FACSFlow™ Sheath Fluid para diluir BD Calibrite™ Beads.
- Agua apta para reactivos (destilada y desionizada).

Tinción y fijación de las células

Las muestras de sangre completa se tiñen primero con los reactivos BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y BD Simultest™ CD3/CD4 (tubo C). Después de la tinción, se utiliza BD FACS™ Lysing Solution diluida (1X) para lisar los eritrocitos. Evite exponer los tubos a la luz directa. Realice el procedimiento a temperatura ambiente (20–25 °C) utilizando reactivos a temperatura ambiente. Consulte el punto Precauciones en la sección 4, Reactivo.

1. Para cada muestra de paciente, etiquete tres tubos A, B y C de 12 x 75 mm. Además, etiquete cada tubo con el número de identificación de la muestra.
2. Coloque 20 µl de reactivo BD Simultest™ Leucogate™ en el tubo A, 20 µl de reactivo BD Simultest™ Control en el tubo B y 20 µl de reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 en el tubo C.
3. Para cada tubo de muestra, utilice una punta de micropipeta nueva y añada con cuidado 100 µl de sangre completa con anticoagulante bien mezclada en el fondo de cada uno de los tres tubos etiquetados. La concentración de leucocitos recomendada es de 3,5 × 10^3 a 9,4 × 10^3 leucocitos/µl. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 15–30 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

NOTA Proteja las muestras de la luz directa durante este procedimiento de incubación y tenga cuidado para evitar que se vierta sangre por el lateral del tubo. Si queda sangre completa en el lateral del tubo, no se teñirá con el reactivo.

4. Diluya BD FACS™ Lysing Solution (10X) a 1X siguiendo las instrucciones que figuran en el punto Reactivos y materiales necesarios que no se suministran de la sección 7, Procedimiento. Añada 2 ml de BD FACS™ Lysing Solution 1X a temperatura ambiente (20–25 °C) en cada tubo. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 10–12 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (20–25 °C). No incube durante más de 12 minutos.

   NOTA Evite la exposición prolongada de las células a los reactivos líticos, ya que podría provocar la destrucción de leucocitos.

5. Inmediatamente después de la incubación, centrifugue los tubos a 300 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

6. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.

7. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para resuspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 2 ml de PBS con azida sódica al 0,1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Centrifugue a 200 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

8. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.

9. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para resuspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 0,5 ml de paraformaldehído al 1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Compruebe que las células estén bien mezcladas con la solución fijadora.

10. Las células ya están listas para analizarse en el citómetro de flujo. Tape o cubra los tubos preparados y almacénelos a una temperatura de 2–8 °C en un lugar oscuro hasta el momento del análisis por citometría de flujo. Analice las células fijadas en las 24 horas posteriores a la tinción. Agite a conciencia las células en el agitador vorticial (a baja velocidad) para reducir la agregación antes de procesarlas en el citómetro de flujo.[25]

Citometría de flujo

Siga las instrucciones de BD para el análisis por citometría de flujo bicolor.

Control de calidad

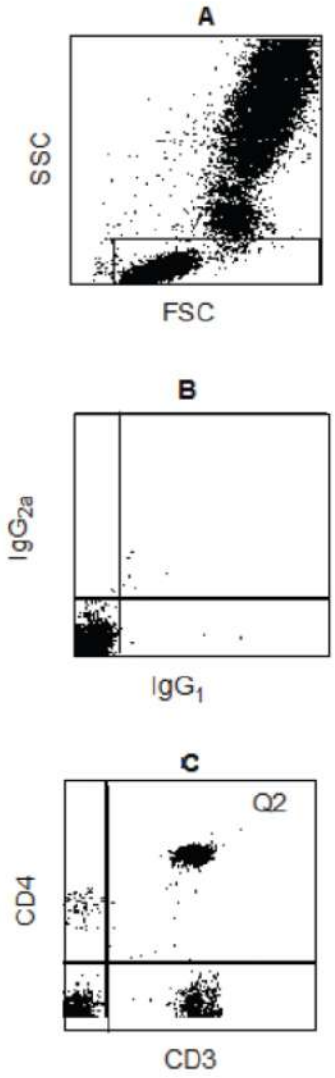
Para obtener resultados óptimos, se recomienda utilizar BD Calibrite™ Beads y el software AutoComp™ para configurar los voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT), ajustar la compensación de fluorescencia y verificar la sensibilidad del instrumento antes de usar el reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 en un citómetro de flujo BD FACScan™.

Se recomienda analizar diariamente una muestra de control de un sujeto adulto normal para optimizar los parámetros del instrumento y como comprobación de control de calidad del sistema. En la figura 1 se muestran los resultados correctos para una muestra de un paciente normal desde el punto de vista hematológico.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Figura 1 Muestra de LWB de BD FACScan™, de un paciente normal desde el punto de vista hematológico, teñida con reactivos BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y BD Simultest™ CD3/CD4 (tubo C).



NOTA El reactivo BD Simultest™ Leucogate™ se utilizó para reducir los residuos, los monocitos y los granulocitos en el área de selección que se muestra para el tubo A. Se muestran gráficos de puntos de comparación de FL1 (eje X) frente a FL2 (eje Y) para los tubos B y C.

El reactivo BD Simultest™ Control se procesa con cada muestra de paciente para definir los marcadores de fluorescencia 1 (FL1) y fluorescencia 2 (FL2) entre grupos de linfocitos teñidos negativa y positivamente, así como para detectar la presencia de tinción inespecífica, que indicaría resultados erróneos del paciente.

Examine visualmente el gráfico de puntos correspondiente al tubo B del reactivo BD Simultest™ Control. Si el grupo negativo es difuso y está esparcido por el intervalo de intensidad de FL2, puede que el marcador no se haya ajustado correctamente y que los resultados no sean fiables.

El software BD Simulset™ examinará automáticamente los datos y alertará al operador mediante una serie de posibles mensajes de error. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario

ESTEBAN ZORZOLI
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

del software BD Simulset™) para obtener una lista con los posibles mensajes. Utilice los criterios siguientes para el examen de los gráficos de puntos obtenidos para cada muestra con el fin de evaluar la calidad de los datos obtenidos.

1. El operador debe rechazar los resultados si recibe uno o más de los mensajes de error siguientes para el control normal: no separation between cellular populations (no hay separación entre poblaciones celulares); too few lymphocytes (less than 500) (linfocitos demasiado escasos [menos de 500]); excessive RBC or nucleated RBC contamination and debris (greater than 10%) (contaminación con eritrocitos excesivos o eritrocitos nucleados y residuos [superior al 10 %]); o excessive monocyte (greater than 3%) or granulocyte (greater than 6%) contamination of the lymphocyte gate (contaminación excesiva con monocitos [superior al 3 %] o granulocitos [superior al 6 %] del área de selección de linfocitos). Si no hay un motivo obvio para que falle el control normal, debe teñirse y procesarse una muestra de otro control normal y repetirse todo el proceso de tinción en todas las muestras siguientes.
2. Las muestras con eritrocitos nucleados pueden contener un exceso de residuos debido a una lisis incompleta de estos con BD FACS™ Lysing Solution. El exceso de residuos puede suceder también cuando se analizan muestras de sangre de pacientes que padecen determinadas alteraciones hematológicas que dificultan la lisis de los eritrocitos, como mielofibrosis y esferocitosis. Los eritrocitos nucleados se contarán como residuos y, si estos superan el 10 %, el software marcará la muestra como «too many nonlymphs in gate» (demasiadas células distintas de linfocitos en el área de selección) y sus resultados deberán rechazarse.
3. La diferencia entre tubos en los eventos incluidos en el área de selección debe ser inferior o igual a 500 eventos para todos los tubos del panel, excepto para el reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A). (Sin embargo, si el tubo del reactivo BD Simultest™ Control presenta problemas, el panel no será fiable).

8. RESULTADOS

Porcentaje de conversión de linfocitos

Cuando se realiza el cálculo del porcentaje de conversión de linfocitos, la subpoblación de linfocitos $CD3^+CD4^+$ se informa como un porcentaje de los linfocitos incluidos en el área de selección para análisis de linfocitos. Si no se realiza el cálculo, los resultados se indican como un porcentaje de los eventos del área de selección.

Fórmula leucocitaria en tres partes

Para la sangre completa lisada, es posible calcular los monocitos, los linfocitos y los granulocitos como un porcentaje de los leucocitos utilizando el reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A). El software BD Simulset™ calcula automáticamente una fórmula leucocitaria en tres partes. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para obtener impresiones de datos representativos.

NOTA La fórmula leucocitaria proporcionada por el software BD Simulset™ debe utilizarse solamente para realizar una comparación con una fórmula leucocitaria independiente con fines de control de calidad y no debe sustituir a una fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente en las historias clínicas de los pacientes ni introducirse en el software BD Simulset™ para obtener recuentos absolutos.

Recuentos absolutos

Puede calcularse un hemograma completo si se obtiene un recuento de leucocitos y el porcentaje de linfocitos de una fórmula leucocitaria independiente mediante procedimientos de laboratorio estándar.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15843
Apoderado
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Para obtener instrucciones sobre cómo calcular recuentos absolutos, consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™).

9. LIMITACIONES

- Es necesario que los laboratorios definan sus propios intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 que puedan verse afectados por el sexo o la edad del paciente, así como la técnica utilizada en la preparación. La raza del paciente también puede influir, aunque aún no se dispone de suficientes datos para respaldar esta afirmación. Es necesario conocer la edad, el sexo, el estado clínico y la raza de los sujetos a la hora de determinar un intervalo de referencia.
- Los resultados del reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 deben utilizarse junto con otra información obtenida de la evaluación clínica y procedimientos de diagnóstico independientes adicionales.
- El reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 no está diseñado para la discriminación de muestras por la presencia de células leucémicas, ni para utilizarse en muestras fenotípicas de pacientes con leucemia. La presencia de blastocitos podría impedir que el reactivo BD Simultest™ Leucogate™ defina un área de selección de análisis de linfocitos adecuada. El software marcará la muestra y no se imprimirán los resultados.
- Los valores de recuento absoluto de las subpoblaciones de linfocitos podrían no ser comparables entre laboratorios debido a las variaciones en los métodos de determinación de recuentos de linfocitos y/o fórmulas leucocitarias.

10. VALORES ESPERADOS

Subpoblaciones de leucocitos

La población de linfocitos T colaboradores/inductores presente en el cuadrante 2 (C2) del tubo C se muestra en la figura 1 y en el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™). Los resultados clínicamente significativos se encuentran en el informe del médico.

BD ha investigado los intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 en 159 sujetos masculinos y femeninos normales utilizando el citómetro de flujo BD FACScan™ en tres centros (dos centros clínicos de EE. UU. y los laboratorios de BD Biosciences en San Jose, California). Los intervalos de referencia normales previstos de linfocitos T colaboradores/inductores para LWB se muestran en la tabla 1.[26]

Tabla 1 Intervalos de referencia representativos para los parámetros del reactivo BD Simultest CD3/CD4 en adultos normales desde el punto de vista hematológico como porcentajes de los linfocitos del área de selección totales (convertidos) (datos agrupados de tres centros clínicos)

Parámetro	Sexo	Edad	n	Media (%)	Intervalo del 95 %
Linfocitos T colaboradores/inductores	Masculino	18–70	84	43	29–57
	Femenino	18–70	75	46	31–61

No se deben utilizar los intervalos de referencia para adultos con muestras de sangre de pacientes pediátricos.

La raza puede ser una variable en la definición de los intervalos de referencia normales,[27] aunque BD no ha recopilado datos suficientes para determinarlo. Los valores normales previstos pueden variar según la edad, el sexo o la raza del paciente. Debido a estas diferencias, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia normal para cada parámetro.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El rendimiento del reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 se estableció mediante análisis en dos centros clínicos de EE. UU. y en los laboratorios de BD Biosciences en San Jose, California.

Reproducibilidad intramuestral

En la tabla 2 se muestra la reproducibilidad intramuestral media obtenida tanto para sujetos normales como para sujetos anómalos.

Reproducibilidad interinstrumental

En la tabla 3 se muestran los resultados de la reproducibilidad interinstrumental.

Reproducibilidad entre laboratorios

La reproducibilidad entre laboratorios se indica mediante la capacidad para agrupar los intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3 CD4 (tabla 1).

Simultest CD3/CD4 frente al método comparativo

En la tabla 4 se presenta un resumen de los resultados.

Tabla 2 Reproducibilidad intramuestral para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 (seis sujetos normales y cuatro sujetos anómalos) como porcentajes de linfocitos (convertidos)

Sujetos	Parámetro	Media (%)	DE[a] en una tinción	df[b]	DE[a] entre tinciones	df[b]
Normales	Linfocitos T colaboradores/inductores	45,8	1,1	12	1,5	10,4
Anómalos	Linfocitos T colaboradores/inductores	31,6	1,1	8	1,1	9,9

a. DE = desviación estándar

b. df = grados de libertad

Tabla 3 Reproducibilidad interinstrumental para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 (cinco sujetos normales y dos instrumentos) como porcentajes de linfocitos (convertidos)

Parámetro	Instrumento	Media (%)	DE	CV[a]
Linfocitos T colaboradores/inductores	1 2	38,6 38,1	1,04 0,88	2,68 2,32

a. CV = coeficiente de variación

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 60 de 196

Tabla 4 Reactivo BD Simultest™ CD3/CD4 frente al método comparativo[a] (panel de reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte y panel de reactivos BD Simultest™ IMK Plus)[b]

Parámetro	Pendiente	Intersección	r	n	Intervalo de datos (%)	
					IMK Plus	IMK-Lymphocyte
Linfocitos T colaboradores/inductores	0,95	–0,27	0,96	84	8–68	8–65

a. Estos datos se recopilaron en un citómetro de flujo BD FACScan™ utilizando reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte que incluían reactivos BD Leucogate™, Control IgG_1/IgG_{2a} y CD3/CD4. El software empleado fue BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, de la familia de software BD Simulset™.

b. Los dos métodos difieren en que el kit BD Simultest™ IMK Plus utiliza el reactivo CD4/CD8 para identificar linfocitos T colaboradores/inductores y supresores/citotóxicos (incluidos los monocitos), mientras que el kit BD Simultest™ IMK-Lymphocyte utiliza los reactivos CD3/CD4 y CD3/CD8 para distinguir las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores/inductores reales y supresores/citotóxicos reales.

Estabilidad de las preparaciones celulares teñidas

Se recomienda analizar las muestras en las 24 horas siguientes a la tinción.

Reactividad cruzada

El anticuerpo CD4 (Leu-3a) reacciona con los monocitos, así como con los linfocitos T colaboradores/inductores.[28]

Linealidad-recuperación

Se espera que los resultados sean lineales entre 3,5 × 103 y 9,4 × 103 leucocitos/µl.

GARANTÍA

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

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

REFERENCIAS

1. Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies.*Blut*. 1989;59:200-206.
2. Nicholson JK. Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immunodeficiency diseases.*Arch Pathol Lab Med*. 1989;113:598-605.
3. Foucar K, Goeken JA. Clinical application of immunologic techniques to the diagnosis of lymphoproliferative and immunodeficiency disorders. *Lab Med*. 1982;13:403-413.
4. Cohen SB, Weetman AP. Activated interstitial and intraepithelial thyroid lymphocytes in autoimmune thyroid disease. Acta Endocrinol *(Copenh.)*. 1988;119:161-166.
5. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus. Correlation with clinical features. *Am J Med*. 1982;72:783-790.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Apoderado
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

6. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS*. 1990;4:479-497.
7. Centers for Disease Control. 1997 Revised guidelines for performing $CD4^+$ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR*. 1997;46:1-29.
8. Giorgi JV, Hultin LE. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clinical Immunology Newsletter*. 1990;10:55-61.
9. Haynes BF. Summary of T-cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds.*Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes.* Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
10. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and T-cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man.*J Exp Med*. 1981;153:310-323.
11. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti–Leu-4 antibody. *J Immunol*. 1983;131:536-539.
12. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes.* Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:259-288.
13. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories: T2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds.*Leucocyte Typing.* New York, NY: Springer-Verlag; 1984:25-60.
14. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD, et al. Thymus-dependent membrane antigens in man: inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to T_{H2} antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:544-548.
15. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood*. 1988;71:603-612.
16. Brenner MB, Groh V, Porcelli SA, et al. Structure and distribution of the human γ/δ T-cell receptor. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:1049-1053.
17. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:629-662.
18. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. 1986;47:333-348.
19. Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312:763-767.
20. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
21. Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html. Accessed March 12, 2019.
22. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document GP41-A6.
23. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
24. Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

25. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
26. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
27. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol*. 1985;3:33-37.
28. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Anti–Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol*. 1983;131:212-216.

PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

Para conocer las patentes de EE. UU. que pueden aplicarse, consulte bd.com/patents.

BD, el logotipo de BD, BD FACSFlow, BD FACStrak, BD Simulset, Calibrite, FACS, FACScan, Leucogate, Simultest y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company o de sus empresas afiliadas. Las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios. © 2023 BD. Todos los derechos reservados.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

Glosario de símbolos

Remítase al etiquetado del producto para consultar los símbolos aplicables.

Símbolo	Significado
	Fabricante
EC REP	Representante autorizado en la Unión Europea
CH REP	Representante autorizado en Suiza
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
SN	Número de serie
STERILE	Estéril
STERILE A	Esterilizado utilizando técnicas de procesado asépticas
STERILE EO	Esterilizado utilizando óxido de etileno
STERILE R	Esterilizado utilizando radiación
STERILE	Esterilizado utilizando vapor de agua o calor seco
	No volver a esterilizar
NON STERILE	No estéril
	No utilizar si el envase está dañado y consúltense las *instrucciones de uso*
STERILE	Vía fluida estéril
STERILE EO	Vía fluida estéril (óxido de etileno)
STERILE R	Vía fluida estéril (irradiación)
	Frágil, manejar con cuidado
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Manténgase seco
	Límite inferior de temperatura
	Límite superior de temperatura
	Límite de temperatura
	Limitación de humedad
	Riesgos biológicos
	No reutilizar
	Consúltense las *instrucciones de uso* o consúltense las *instrucciones de uso* electrónicas
	Precaución
LATEX	Contenido o presencia de látex de caucho natural
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
CONTROL -	Control negativo
CONTROL +	Control positivo
Σ	Contenido suficiente para <*n*> pruebas
	Sólo para la evaluación del funcionamiento en diagnóstico in vitro
	Apirógeno
#	Número de paciente
	Este lado hacia arriba
	No apilar

Símbolo	Significado
	Sistema de barrera estéril única
PHT DEHP BBP	Contenido o presencia de ftalato: combinación de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y butilbenciftalato (BBP)
	Recoger por separado Indica la recogida por separado obligatoria de los residuos de aparatos eléctricos y electrónicos.
CE	Marcado CE; significa que cumple con la especificación técnica europea
	Prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente
	Producto para autodiagnóstico
Rx Only	Esto solo se aplica a EE. UU.: «Precaución: La ley federal estadounidense impone restricciones sobre este dispositivo, cuya venta debe ser realizada por un médico o por orden de este».
CC	País de fabricación «CC» debe sustituirse por el código de país de dos o tres letras.
	Hora de recogida
	Cortar
	Despegar por aquí
	Fecha de recogida
	Manténgase fuera de la luz
H_2	Se produce gas de hidrógeno
	Perforación
	Número de secuencia del panel de inicio
	Número de secuencia del panel final
	Número de secuencia interno
/	<n.º de envase>/<total de envases>
MD	Producto sanitario
	Contiene sustancias peligrosas
	Marca de conformidad ucraniana
FC	Cumple los requisitos de la FCC conforme a 21 CFR, parte 15
c UL us	Certificación de producto UL para EE. UU. y Canadá
UDI	Identificador único de dispositivo
	Importador
	Colocar la etiqueta del paciente únicamente en el área enmarcada
MR	Compatible con la resonancia magnética (RM)
MR	Compatibilidad condicional con la resonancia magnética (RM)
MR	Incompatible con la resonancia magnética (RM)
For use with	Para uso con
This Product Contains Dry Natural Rubber	Este producto contiene goma natural seca
For Export Only	Solo para exportación
Instruments	Instrumentos

Nota: La disposición del texto en los símbolos viene determinada por el diseño de la etiqueta.

L006715(08) 2023-03

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
155 North McCarthy Boulevard
Milpitas, California 95035 USA

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Road
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Limited
14B George Bourke Drive
Mt. Wellington Auckland 1060
New Zealand

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite bdbiosciences.com.

ClinicalApplications@bd.com

eifu.bd.com

HISTORIAL

Revisión	Fecha	Cambios realizados
23-2639(04)	2023-08	Se ha actualizado la dirección legal del fabricante. Se ha actualizado el glosario de símbolos. Se ha añadido la sección «Historial». Se ha actualizado la sección «Patentes y marcas comerciales». Se ha añadido el símbolo «Rx Only» utilizado bajo prescripción. Se ha actualizado la sección «Reactivos y materiales necesarios que no se suministran».

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

BD Simultest™ CD3/CD8

Para la determinación de porcentajes de linfocitos T supresores/citotóxicos humanos en sangre periférica

50 análisis, n.º de catálogo 340044

23-2645(04)
2023-08
Español

℞ Only IVD

1. USO PREVISTO

BD Simultest™ CD3/CD8 (Leu-4/2a) es un reactivo de inmunofluorescencia directa de dos colores que se utiliza para enumerar porcentajes de linfocitos T supresores/citotóxicos humanos maduros en sangre completa con eritrocitos lisados (LWB).

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los linfocitos humanos pueden dividirse en tres poblaciones principales según su función biológica y en la expresión de antígenos de superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos citolíticos naturales (NK). Los linfocitos T participan en la inmunidad mediada por células específicas del antígeno y regulan la secreción de inmunoglobulina por los linfocitos B. Los linfocitos T se pueden clasificar también según sus propiedades funcionales como colaboradores/inductores y supresores/citotóxicos.

Aplicaciones clínicas

NOTA No en todos los estudios de esta sección se han empleado reactivos de BD.

Los linfocitos T supresores/citotóxicos son una subpoblación de linfocitos T ($CD3^+$) que son $CD8^+$. Los porcentajes de linfocitos T supresores/citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) se pueden utilizar para caracterizar y controlar algunas formas de enfermedades de inmunodeficiencia y autoinmunitarias.

Un porcentaje de linfocitos T supresores/citotóxicos puede quedar fuera del intervalo de referencia normal en algunas enfermedades autoinmunitarias y en determinadas reacciones inmunitarias, como la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) aguda[1,2] y el rechazo de los trasplantes.[3] El porcentaje relativo de la subpoblación $CD8^+$ es elevado en un gran número de pacientes con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, como la inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).[4,5] (Los Centers for Disease Control, CDC [Centros para el Control de Enfermedades] recomiendan utilizar una combinación de reactivos de dos colores que contenga anticuerpos CD3 y CD8 para determinar el porcentaje de linfocitos T CD8+ en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana [VIH].)[6] El porcentaje relativo de la población celular $CD8^+$ con frecuencia disminuye en el lupus eritematoso generalizado (LEG) activo, pero también puede aumentar en pacientes con LEG sometidos a terapia con esteroides.[7]

NOTA El reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 permite identificar y enumerar los linfocitos T supresores/citotóxicos por separado de los linfocitos citolíticos naturales $CD3^-CD8^+$ contaminantes.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se añaden reactivos de anticuerpos monoclonales a la sangre humana completa, los anticuerpos marcados con-fluorocromo se unen específicamente a los antígenos de la superficie de los leucocitos. Los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse para identificar subpoblaciones de linfocitos.

Una muestra parcial (alícuota) del paciente teñida se introduce en el citómetro de flujo y pasa en una estrecha corriente a través del trayecto de un haz de láser. Las células teñidas emiten fluorescencia cuando las excita el haz del láser, y la luz emitida se recoge y procesa mediante el citómetro de flujo.

4. REACTIVO

Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis

El reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 (suficiente para 50 análisis) se suministra en 1 ml de solución salina tamponada con gelatina y azida sódica al 0,1 %. Contiene CD3 marcado con FITC (Leu-4), clon SK7,[8-11] y CD8 marcado con PE (Leu-2a), clon SK1,[12] para identificar la población de linfocitos T supresores/citotóxicos ($CD3^+CD8^+$). La relación fluoresceína-proteína (F:P) para los reactivos de anticuerpos monoclonales IgG de BD es de 2 a 5. La relación F:P para CD3 (Leu-4) FITC se ha optimizado para su uso previsto.

El anticuerpo CD3 (Leu-4) está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 de ratón y cadenas ligeras kappa. CD3 reacciona con la cadena épsilon del complejo CD3/receptor del antígeno de células T (TCR).[13] Este complejo está formado por al menos seis proteínas, con pesos moleculares entre 20 y 30 kilodaltons (kDa).[14] El antígeno reconocido por anticuerpos CD3 se asocia de forma no covalente a TCR α/β o γ/δ (70–90 kDa).[15]

El anticuerpo CD8 (Leu-2a) está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 de ratón y cadenas ligeras kappa. El antígeno CD8 está presente en la subpoblación de linfocitos T supresores/citotóxicos humanos[9,16], así como en una subpoblación de linfocitos citolíticos naturales (NK).[17] El determinante CD8 antigénico interactúa con las moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (CHP) de clase I, lo que da como resultado una mayor adhesión entre los linfocitos T $CD8^+$ y las células diana.[18-20] La unión del antígeno CD8 con las moléculas del CHP de clase I mejora la activación de los linfocitos T en reposo.[18-21] El antígeno CD8 se expresa como un complejo bimolecular unido por enlaces disulfuro con una subunidad α de 32-kDa.[22] El dominio citoplásmico de la subunidad α del antígeno CD8 está asociado a la proteína tirosina quinasa $p56^{lck}$.[20,21]

Precauciones

- Para uso diagnóstico in vitro.
- Cuando se almacena a una temperatura de 2–8 °C, el reactivo de anticuerpo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No se debe utilizar después de la fecha de caducidad.
- El reactivo de anticuerpo no se debe congelar ni exponer a la luz directa durante el almacenamiento o la incubación con células. Mantenga seco el vial del reactivo.
- Cualquier alteración en el aspecto del reactivo, como la precipitación o decoloración, es un indicio de inestabilidad o deterioro. En ese caso, no utilice el reactivo.
- El reactivo del anticuerpo contiene azida sódica como conservante. Sin embargo, es preciso extremar las precauciones para evitar la contaminación microbiana, que podría causar resultados erróneos.

ADVERTENCIA Se consideran de riesgo biológico todas las muestras biológicas y todos los materiales que hayan entrado en contacto con ellas. Manipular como si pudieran transmitir alguna infección[23,24] y desechar tomando las precauciones adecuadas según la normativa federal, estatal y local. Nunca pipetee con la boca. Utilice ropa protectora, protección ocular y guantes adecuados.

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 67 de 196

Las concentraciones se muestran en la tabla siguiente:

Reactivo	Concentración (µg/ml)
CD3 FITC	25,0
CD8 PE	6,25

5. INSTRUMENTO

El reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 está diseñado para utilizarse en un citómetro de flujo de BD que esté equipado con el hardware, el software y la electrónica de conmutación adecuados. El citómetro de flujo debe estar equipado para detectar fluorescencia de dos colores, dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC). Se recomienda utilizar el software BD Simulset™, versión 2.5 o posteriores, para la adquisición y el análisis de datos.

Todas las características de rendimiento se obtuvieron con un citómetro de flujo BD FACScan™ y se verificaron en un citómetro de flujo BD FACStrak™. Es posible que los demás sistemas tengan características distintas, por lo que el usuario deberá verificarlos.

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Recoja sangre asépticamente por venopunción[25,26] utilizando un BD Vacutainer® Blood Collection Tube de EDTA estéril. Para este procedimiento se necesita como mínimo 1 ml de sangre completa. Para obtener resultados óptimos, la sangre debe teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. La sangre con anticoagulante puede almacenarse a temperatura ambiente (20–25 °C) durante un máximo de 6 horas, hasta que esté lista para la tinción. Las muestras de sangre que se refrigeren antes de la tinción pueden arrojar resultados anómalos.

Deben hacerse un recuento de leucocitos y una fórmula leucocitaria a partir de la misma muestra de sangre completa antes de la tinción. Se considera aceptable un intervalo de concentración de leucocitos de $3,5 \times 10^3$ a $9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl. Las muestras con hemogramas superiores a $9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl deben diluirse con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X que contenga acida sódica al 0,1 %. Para muestras con recuentos inferiores a $3,5 \times 10^3$ leucocitos/µl podría ser necesaria más sangre, así como un procedimiento de separación para concentrar las células.

Condiciones que causan interferencias

No deben utilizarse muestras de pacientes previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre completa que se refrigeren antes de la tinción pueden arrojar resultados anómalos. Para obtener resultados óptimos, las muestras de sangre deben teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. Las muestras obtenidas de pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores pueden ofrecer una escasa diferenciación.[27] La presencia de blastocitos o de eritrocitos no lisados o nucleados puede interferir en los resultados del análisis. Las muestras hemolizadas deben rechazarse. Siga las indicaciones del fabricante del tubo de recogida para conocer cuál es el volumen mínimo de sangre que se debe recoger.

PRECAUCIÓN Tome las precauciones habituales al recoger, manipular y desechar todas las muestras de sangre humana y reactivos potencialmente cancerígenos.

7. PROCEDIMIENTO

Reactivo suministrado

Consulte Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis y Precauciones en la sección 4, Reactivo.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Reactivos y materiales necesarios que no se suministran

- Reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (CD45/CD14), 1 ml (n.º de catálogo 340040). Para determinar el área de selección de los análisis de linfocitos, consulte las instrucciones de uso de BD Simultest™ Leucogate™ y el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™). Conserve a 2–8 °C.
- BD Simultest™ Control γ_1/γ_{2a} (IgG_1 FITC/IgG_{2a} PE) (ambos específicos de hemocianina de lapa californiana), 1 ml (n.º de catálogo: 340041). Conserve a 2–8 °C.
- BD FACS™ Lysing Solution (10X), 100 ml (n.º de catálogo 349202). Conserve a 2–25 °C. Para usarlo, diluya a 1:10 con agua apta para reactivos a temperatura ambiente (20–25 °C). Conserve en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente. La solución preparada se mantendrá estable durante un mes a temperatura ambiente. Consulte las instrucciones de uso de BD FACS™ Lysing Solution.
- BD Calibrite™ Beads (n.º de catálogo 349502). Para obtener información de uso detallada, consulte las instrucciones de uso de *BD Calibrite™ Beads*.
- BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tubes o equivalentes.
- Tubos de ensayo Falcon® desechables de poliestireno de 12 × 75 mm o equivalente.
- Agitador vorticial.
- Centrifugadora de baja velocidad (velocidad mínima 200 *g*) con rotor de cesto giratorio y soportes para tubos de 12 x 75 mm.
- Aspirador de vacío con depósito.
- Micropipeta con puntas.
- Tampón de lavado de PBS con azida sódica al 0,1 %.
- Solución fijadora (solución de paraformaldehído [PFA] al 1 % en PBS 1X con azida sódica al 0,1 %).

  Almacene a una temperatura de 2–8 °C en un recipiente de vidrio ámbar durante un máximo de 1 semana.
- BD FACSFlow™ Sheath Fluid (n.º de catálogo 342003) o equivalente.

  PRECAUCIÓN Utilice únicamente el diluyente BD FACSFlow Sheath Fluid para diluir BD Calibrite™ Beads.
- Agua apta para reactivos (destilada y desionizada).

Tinción y fijación de las células

Las muestras de sangre completa se tiñen primero con los reactivos BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y BD Simultest™ CD3/CD8 (tubo C). Después de la tinción, se utiliza BD FACS™ Lysing Solution (1X) diluida para lisar los eritrocitos. Evite exponer los tubos a la luz directa. Realice el procedimiento a temperatura ambiente (20–25 °C) utilizando reactivos a temperatura ambiente. Consulte el punto Precauciones en la sección 4, Reactivo.

1. Para cada muestra de paciente, etiquete tres tubos A, B y C de 12 x 75 mm. Además, etiquete cada tubo con el número de identificación de la muestra.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

2. Coloque 20 µl de reactivo BD Simultest™ Leucogate™ en el tubo A, 20 µl de reactivo BD Simultest™ Control en el tubo B y 20 µl de reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 en el tubo C.

3. Para cada tubo de muestra, utilice una punta de micropipeta nueva y añada con cuidado 100 µl de sangre completa con anticoagulante bien mezclada en el fondo de cada uno de los tres tubos etiquetados. La concentración de leucocitos recomendada es de 3,5 × 10^3 a 9,4 × 10^3 leucocitos/µl. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 15–30 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

   NOTA Proteja las muestras de la luz directa durante este procedimiento de incubación y tenga cuidado para evitar que se vierta sangre por el lateral del tubo. Si queda sangre completa en el lateral del tubo, no se teñirá con el reactivo.

4. Diluya BD FACS™ Lysing Solution (10X) a 1X siguiendo las instrucciones que figuran en el punto Reactivos y materiales necesarios que no se suministran de la sección 7, Procedimiento. Añada 2 ml de BD FACS™ Lysing Solution 1X a temperatura ambiente (20–25 °C) en cada tubo. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 10–12 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (20–25 °C). No incube durante más de 12 minutos.

   NOTA Evite la exposición prolongada de las células a los reactivos líticos, ya que podría provocar la destrucción de leucocitos.

5. Inmediatamente después de la incubación, centrifugue los tubos a 300 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

6. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.

7. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para resuspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 2 ml de PBS con azida sódica al 0,1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Centrifugue a 200 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

8. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.

9. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para volver a suspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada paraformaldehído al 1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Compruebe que las células estén bien mezcladas con la solución fijadora.

10. Las células ya están listas para analizarse en el citómetro de flujo. Tape o cubra los tubos preparados y almacénelos a una temperatura de 2–8 °C en un lugar oscuro hasta el momento del análisis por citometría de flujo. Analice las células fijadas en las 24 horas posteriores a la tinción. Agite a conciencia las células en el agitador vorticial (a baja velocidad) para reducir la agregación antes de procesarlas en el citómetro de flujo.[28]

Citometría de flujo

Siga las instrucciones de BD para el análisis por citometría de flujo bicolor.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

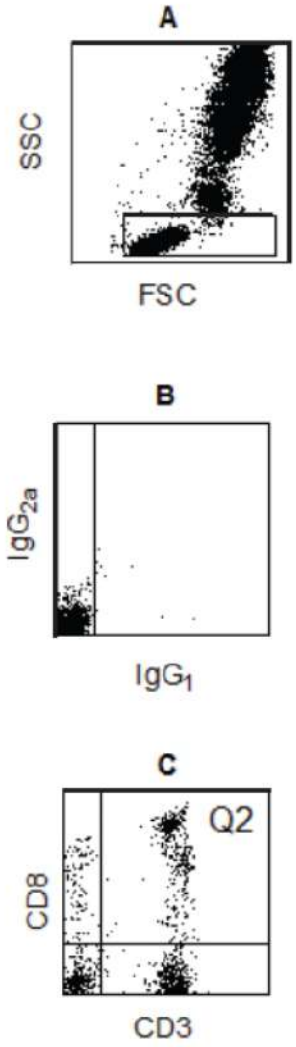
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Control de calidad

Para obtener resultados óptimos, se recomienda utilizar BD Calibrite™ Beads y el software AutoComp™ para configurar los voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT), ajustar la compensación de fluorescencia y verificar la sensibilidad del instrumento antes de usar el reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 en un citómetro de flujo BD FACScan™.

Se recomienda analizar diariamente una muestra de control de un sujeto adulto normal para optimizar los parámetros del instrumento y como comprobación de control de calidad del sistema. En la figura 1 se muestran los resultados correctos para un paciente normal desde el punto de vista hematológico.

Figura 1 Muestra de LWB de BD FACScan™, de un paciente normal desde el punto de vista hematológico, teñida con reactivos BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y BD Simultest™ CD3/CD8 (tubo C).



ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

NOTA El reactivo BD Simultest™ Leucogate™ se utilizó para reducir los residuos, los monocitos y los granulocitos en el área de selección que se muestra para el tubo A. Se muestran gráficos de puntos de comparación de FL1 (eje-X) frente a FL2 (eje-Y) para los tubos B y C.

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

El reactivo BD Simultest™ Control se procesa con cada muestra de paciente para definir los marcadores de fluorescencia 1 (FL1) y fluorescencia 2 (FL2) entre grupos de linfocitos teñidos negativa y positivamente, así como para detectar la presencia de tinción inespecífica, que indicaría resultados erróneos del paciente.

Examine visualmente el gráfico de puntos correspondiente al reactivo BD Simultest™ Control (tubo B). Si el grupo negativo se muestra difuso y esparcido por el intervalo de intensidad de FL2, puede que el marcador no se haya ajustado correctamente y que los resultados no sean fiables.

El software BD Simulset™ examinará automáticamente los datos y alertará al operador mediante una serie de posibles mensajes de error. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para obtener una lista con los posibles mensajes. Utilice los criterios siguientes para el examen de los gráficos de puntos obtenidos para cada muestra con el fin de evaluar la calidad de los datos obtenidos.

- El operador debe rechazar los resultados si recibe uno o más de los mensajes de error siguientes para el control normal: no separation between cellular populations (no hay separación entre poblaciones celulares); too few lymphocytes (less than 500) (linfocitos demasiado escasos [menos de 500]); excessive RBC or nucleated RBC contamination and debris (greater than 10%) (contaminación con eritrocitos excesivos o eritrocitos nucleados y residuos [superior al 10 %]); o excessive monocyte (greater than 3%) or granulocyte (greater than 6%) contamination of the lymphocyte gate (contaminación excesiva con monocitos [superior al 3 %] o granulocitos [superior al 6 %] del área de selección de linfocitos).
- Si no hay un motivo obvio para que falle el control normal, debe teñirse y procesarse una muestra de otro control normal y repetirse todo el proceso de tinción en todas las muestras siguientes.
- Las muestras con eritrocitos nucleados pueden contener un exceso de residuos debido a una lisis incompleta de estos con BD FACS™ Lysing Solution. El exceso de residuos puede suceder también cuando se analizan muestras de sangre de pacientes que padecen determinadas alteraciones hematológicas que dificultan la lisis de los eritrocitos, como mielofibrosis y esferocitosis. Los eritrocitos nucleados se contarán como residuos y, si estos superan el 10 %, el software marcará la muestra como «too many nonlymphs in gate» (demasiadas células distintas de linfocitos en el área de selección) y sus resultados deberán rechazarse.
- La diferencia entre tubos en los eventos incluidos en el área de selección debe ser inferior o igual a 500 eventos para todos los tubos del panel, excepto para el reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A). (Sin embargo, si el tubo del reactivo BD Simultest™ Control presenta problemas, el panel no será fiable).

8. RESULTADOS

Porcentaje de conversión de linfocitos

Cuando se realiza el cálculo del porcentaje de conversión de linfocitos, la subpoblación de linfocitos $CD3^+CD8^+$ se informa como un porcentaje de los linfocitos incluidos en el área de selección para análisis de linfocitos. Si no se realiza el cálculo, los resultados se indican como un porcentaje de los eventos del área de selección.

Fórmula leucocitaria en tres partes

Para la sangre completa lisada, es posible calcular los monocitos, los linfocitos y los granulocitos como un porcentaje de los leucocitos utilizando el reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A). El software BD Simulset™ calcula automáticamente una fórmula leucocitaria en tres partes. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para obtener impresiones de datos representativos.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

NOTA La fórmula leucocitaria proporcionada por el software BD Simulset™ debe utilizarse solamente para realizar una comparación con una fórmula leucocitaria independiente con fines de control de calidad y no debe sustituir a una fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente en las historias clínicas de los pacientes ni introducirse en el software BD Simulset™ para obtener recuentos absolutos.

Recuentos absolutos

Puede calcularse un recuento celular absoluto si se obtiene un recuento de leucocitos y el porcentaje de linfocitos de una fórmula leucocitaria independiente mediante procedimientos de laboratorio estándar. Para obtener instrucciones sobre cómo calcular recuentos absolutos, consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™).

9. LIMITACIONES

- Es necesario que los laboratorios definan sus propios intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 que puedan verse afectados por el sexo o la edad del paciente, así como la técnica utilizada en la preparación. La raza del paciente también puede influir, aunque aún no se dispone de suficientes datos para respaldar esta afirmación. Es necesario conocer la edad, el sexo, el estado clínico y la raza de los sujetos a la hora de determinar un intervalo de referencia.
- Los resultados del reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 deben utilizarse junto con otra información obtenida de la evaluación clínica y procedimientos de diagnóstico independientes adicionales.
- El reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 no está diseñado para la discriminación de muestras por la presencia de células leucémicas, ni para utilizarse en muestras fenotípicas de pacientes con leucemia. La presencia de blastocitos podría impedir que el reactivo BD Simultest™ Leucogate™ defina un área de selección de análisis de linfocitos adecuada. El software marcará la muestra y no se imprimirán los resultados.
- Los valores de recuento absoluto de las subpoblaciones de linfocitos podrían no ser comparables entre laboratorios debido a las variaciones en los métodos de determinación de recuentos de linfocitos y/o fórmulas leucocitarias.

10. VALORES ESPERADOS

Subpoblaciones de leucocitos

La población de linfocitos T supresores/citotóxicos presente en el cuadrante 2 (C2) del tubo C se muestra en la figura 1 y en el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™). Los resultados clínicamente significativos se encuentran en el informe del médico.

BD ha investigado los intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 en 159 sujetos masculinos y femeninos normales mediante el citómetro de flujo BD FACScan™ en tres centros (dos centros clínicos de EE. UU. y los laboratorios de BD Biosciences en San Jose, California). Los intervalos de referencia normales previstos de linfocitos T supresores/citotóxicos para LWB se muestran en la tabla 1.[29]

Tabla 1 Intervalos de referencia representativos para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 en adultos normales desde el punto de vista hematológico como porcentajes de los linfocitos del área de selección totales (convertidos) (datos agrupados de tres centros clínicos)

Parámetro	Sexo	Edad	n	Media	Intervalo del 95 %
Linfocitos T supresores/citotóxicos	Ambos	18–70	159	25	11–38

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

No se deben utilizar los intervalos de referencia para adultos con muestras de sangre de pacientes pediátricos.

La raza puede ser una variable en la definición de los intervalos de referencia normales,[30] aunque BD no ha recopilado datos suficientes para determinarlo. Los valores normales previstos pueden variar según la edad, el sexo o la raza del paciente. Debido a estas diferencias, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia normal para cada parámetro.

11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El rendimiento del reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 se estableció mediante análisis en dos centros clínicos de EE. UU. y en los laboratorios de BD Biosciences en San Jose, California.

Reproducibilidad intramuestral

En la tabla 2 se muestra la reproducibilidad intramuestral media obtenida tanto para sujetos normales como para sujetos anómalos.

Reproducibilidad interinstrumental

En la tabla 3 se muestran los resultados de la reproducibilidad interinstrumental.

Reproducibilidad entre laboratorios

La reproducibilidad entre laboratorios se indica mediante la capacidad para agrupar los intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3 CD8 (tabla 1).

BD Simultest™ CD3/CD8 frente al método comparativo

En la tabla 4 se presenta un resumen de los resultados.

Tabla 2 Reproducibilidad intramuestral para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 (seis sujetos normales y cuatro sujetos anómalos) como porcentajes de linfocitos (convertidos)

Sujetos	Parámetro	Media	DE[a] en una tinción	df[b]	DE[a] entre tinciones	df[b]
Normales	Linfocitos T supresores/citotóxicos	27,2	0,8	12	1,1	11,1
Anómalos	Linfocitos T supresores/citotóxicos	51,4	1,4	8	1,6	8,8

a. DE = desviación estándar

b. df = grados de libertad

Tabla 3 Reproducibilidad interinstrumental para el parámetro del reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 (cinco sujetos normales y dos instrumentos) como porcentajes de linfocitos (convertidos)

Parámetro	Instrumento	Media	DE	CV[a]
Linfocitos T supresores/citotóxicos	1	28,9	1,04	3,58
	2	27,6	1,00	3,62

a. CV = coeficiente de variación

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Tabla 4 Reactivo BD Simultest™ CD3/CD8 frente al método comparativo[a] (panel de reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte y panel de reactivos BD Simultest™ IMK Plus)[b]

Parámetro	Pendiente	Intersección	r	n	Intervalo de datos (%)	
					IMK Plus	IMK-Lymphocyte
Linfocitos T supresores/citotóxicos	1,01	–6,03	0,93	84	19–74	12–67

a. Estos datos se recopilaron en un citómetro de flujo BD FACScan™ utilizando reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, que incluían Leucogate™, Control γ_1 /γ_{2a}, y CD3/CD8. El software empleado fue BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, de la familia de software BD Simulset™.

b. Los dos métodos difieren en que el kit BD Simultest™ IMK Plus utiliza el reactivo CD4/CD8 para identificar linfocitos colaboradores/inductores y supresores/citotóxicos (incluidos los linfocitos citolíticos naturales), mientras que el kit BD Simultest™ IMK-Lymphocyte utiliza los reactivos CD3/CD4 y CD3/CD8 para distinguir las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores/inductores reales y supresores/citotóxicos reales.

Estabilidad de las preparaciones celulares teñidas

Se recomienda analizar las muestras en las 24 horas siguientes a la tinción.

Reactividad cruzada

El anticuerpo CD8 (Leu-2a) reacciona con los linfocitos citolíticos naturales,[31] así como con los linfocitos T supresores/citotóxicos.

Linealidad-recuperación

Se espera que los resultados sean lineales entre $3,5 \times 10^3$ y $9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl.

GARANTÍA

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

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

REFERENCIAS

1. Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Defective suppressor cell function mediated by T8+ cell lines from patients with progressive multiple sclerosis. *J Immunol*. 1986;137:3436-3439.
2. Gratama J, Naipal A, Oljans P, et al. T lymphocyte repopulation and differentiation after bone marrow transplantation. Early shifts in the ratio between T4+ and T8+ T lymphocytes correlate with the occurrence of acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1984;63:1416-1423.
3. Bishop G, Hall B, Duggin G, Horvath J, Sheil A, Tiller D. Immunopathology of renal allograft rejection analyzed with monoclonal antibodies to mononuclear cell markers. *Kidney Internat*. 1986;29:708-717.
4. Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut*. 1989;59:200-206.
5. Giorgi JV, Hultin LE. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clinical Immunology Newsletter*. 1990;10:55-61.
6. Centers for Disease Control. 1997 Revised guidelines for performing $CD4^+$ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR*. 1997;46:1-29.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

7. Wolde-Mariam W, Peter J. Recent diagnostic advances in cellular immunology. *Diagnost Med*. 1984;7:25-32.
8. Haynes BF. Summary of T-cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
9. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and T-cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med*. 1981;153:310-323.
10. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti–Leu-4 antibody. *J Immunol*. 1983;131:536-539.
11. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:259-288.
12. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories: T2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leucocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:25-60.
13. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood*. 1988;71:603-612.
14. Brenner MB, Groh V, Porcelli SA, et al. Structure and distribution of the human γ/δ T-cell receptor. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:1049-1053.
15. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:629-662.
16. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD, et al. Thymus-dependent membrane antigens in man: inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to T_{H2} antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:544-548.
17. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol*. 1983;131:1789-1796.
18. Anderson P, Blue M-L, Morimoto C, Schlossman SF. Cross-linking of T3 (CD3) with T4 (CD4) enhances the proliferation of resting T lymphocytes. *J Immunol*. 1987;139:678-682.
19. Eichmann K, Jönsson J-I, Falk I, Emmrich F. Effective activation of resting mouse T lymphocytes by. cross-linking submitogenic concentrations of the T cell antigen receptor with either Lyt-2 or L3T4. *Eur J Immunol*. 1987;17:643-650.
20. Gallagher PF, Fazekas de St. Groth B, Miller JFAP. CD4 and CD8 molecules can physically associate with the same T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 1989;86:10044-10048.
21. Rudd CE, Burgess KE, Barber EK, Schlossman SF. Monoclonal antibodies to the CD4 and CD8 antigens precipitate variable amounts of CD4/CD8-associated $p56^{lck}$ activity. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:326-327.
22. Moebius U. Cluster report: CD8. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
23. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
24. Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html. Accessed March 12, 2019.
25. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document GP41-A6.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

26. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry—Second Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
27. Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
28. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
29. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath.* 1991;60:190-208.
30. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol.* 1985;3:33-37.
31. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol.* 1983;131:1789-1796.

PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

Para conocer las patentes de EE. UU. que pueden aplicarse, consulte bd.com/patents.

BD, el logotipo de BD, BD FACSFlow, BD FACStrak, BD Simulset, Calibrite, FACS, FACScan, Leucogate, Simultest y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company o de sus empresas afiliadas. Las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios. © 2023 BD. Todos los derechos reservados.

E. ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

Glosario de símbolos

Remítase al etiquetado del producto para consultar los símbolos aplicables.

Símbolo	Significado
	Fabricante
EC REP	Representante autorizado en la Unión Europea
CH REP	Representante autorizado en Suiza
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
SN	Número de serie
STERILE	Estéril
STERILE A	Esterilizado utilizando técnicas de procesado asépticas
STERILE EO	Esterilizado utilizando óxido de etileno
STERILE R	Esterilizado utilizando radiación
STERILE	Esterilizado utilizando vapor de agua o calor seco
	No volver a esterilizar
NON STERILE	No estéril
	No utilizar si el envase está dañado y consúltense las *instrucciones de uso*
STERILE	Vía fluida estéril
STERILE EO	Vía fluida estéril (óxido de etileno)
STERILE R	Vía fluida estéril (irradiación)
	Frágil, manejar con cuidado
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Manténgase seco
	Límite inferior de temperatura
	Límite superior de temperatura
	Límite de temperatura
	Limitación de humedad
	Riesgos biológicos
	No reutilizar
	Consúltense las *instrucciones de uso* o consúltense las *instrucciones de uso* electrónicas
	Precaución
LATEX	Contenido o presencia de látex de caucho natural
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
CONTROL -	Control negativo
CONTROL +	Control positivo
Σ	Contenido suficiente para <*n*> pruebas
	Sólo para la evaluación del funcionamiento en diagnóstico in vitro
	Apirógeno
#	Número de paciente
	Este lado hacia arriba
	No apilar

Símbolo	Significado
	Sistema de barrera estéril única
PHT DEHP BBP	Contenido o presencia de ftalato: combinación de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y butilbenciftalato (BBP)
	Recoger por separado Indica la recogida por separado obligatoria de los residuos de aparatos eléctricos y electrónicos.
CE	Marcado CE; significa que cumple con la especificación técnica europea
	Prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente
	Producto para autodiagnóstico
Rx Only	Esto solo se aplica a EE. UU.: «Precaución: La ley federal estadounidense impone restricciones sobre este dispositivo, cuya venta debe ser realizada por un médico o por orden de este».
CC	País de fabricación «CC» debe sustituirse por el código de país de dos o tres letras.
	Hora de recogida
	Cortar
	Despegar por aquí
	Fecha de recogida
	Manténgase fuera de la luz
H_2	Se produce gas de hidrógeno
	Perforación
	Número de secuencia del panel de inicio
	Número de secuencia del panel final
	Número de secuencia interno
/	<n.º de envase>/<total de envases>
MD	Producto sanitario
	Contiene sustancias peligrosas
	Marca de conformidad ucraniana
FC	Cumple los requisitos de la FCC conforme a 21 CFR, parte 15
c UL us	Certificación de producto UL para EE. UU. y Canadá
UDI	Identificador único de dispositivo
	Importador
	Colocar la etiqueta del paciente únicamente en el área enmarcada
MR	Compatible con la resonancia magnética (RM)
MR	Compatibilidad condicional con la resonancia magnética (RM)
MR	Incompatible con la resonancia magnética (RM)
For use with	Para uso con
This Product Contains Dry Natural Rubber	Este producto contiene goma natural seca
For Export Only	Solo para exportación
Instruments	Instrumentos

Nota: La disposición del texto en los símbolos viene determinada por el diseño de la etiqueta.

L006715(08) 2023-03

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
155 North McCarthy Boulevard
Milpitas, California 95035 USA

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Road
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Limited
14B George Bourke Drive
Mt. Wellington Auckland 1060
New Zealand

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite bdbiosciences.com.

ClinicalApplications@bd.com

eifu.bd.com

HISTORIAL

Revisión	Fecha	Cambios realizados
23-2645(04)	2023-08	Se ha actualizado la dirección legal del fabricante. Se ha actualizado el glosario de símbolos. Se ha añadido la sección «Historial». Se ha actualizado la sección «Patentes y marcas comerciales». Se ha añadido el símbolo «Rx Only» utilizado bajo prescripción. Se ha actualizado la sección «Reactivos y materiales necesarios que no se suministran».

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

BD Simultest™ CD3/Anti-HLA-DR

Para la determinación de porcentajes de linfocitos T humanos activados en sangre periférica.

50 análisis, n.º de catálogo 340048

23-2651(04)
2023-08
Español

℞ Only IVD

1. USO PREVISTO

BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR (Leu-4/Anti–HLA-DR) es un reactivo de inmunofluorescencia directa de dos colores que se utiliza para enumerar porcentajes de linfocitos T humanos maduros activados en sangre completa con eritrocitos lisados (LWB).

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los linfocitos humanos pueden dividirse en tres poblaciones principales según su función biológica y en la expresión de antígenos de superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos citolíticos naturales (NK). Los linfocitos T participan en la inmunidad mediada por células específicas del antígeno y regulan la secreción de inmunoglobulina por los linfocitos B. Los linfocitos T también se pueden clasificar según sus propiedades funcionales como linfocitos T colaboradores/inductores, supresores/citotóxicos o activados.

Aplicaciones clínicas

Los linfocitos T activados (linfocitos T HLA-DR$^+$) se pueden elevar en estados de activación inmunitaria,[1] que puede estar causada por una infección[2-5] o un rechazo inminente del trasplante.[6] La causa real de la activación inmunitaria debe comprobarse mediante la realización de análisis clínicos y de laboratorio adicionales.

NOTA No en todos los estudios de esta sección se han empleado reactivos de BD.

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se añaden reactivos de anticuerpos monoclonales a la sangre humana completa, los anticuerpos marcados con fluorocromo se unen específicamente a los antígenos de la superficie de los leucocitos. Los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse para identificar subpoblaciones de linfocitos.

Una muestra parcial (alícuota) del paciente teñida se introduce en el citómetro de flujo y pasa en una estrecha corriente a través del trayecto de un haz de láser. Las células teñidas emiten fluorescencia cuando las excita el haz del láser, y la luz emitida se recoge y procesa mediante el citómetro de flujo.

4. REACTIVO

Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis

El reactivo BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR (suficiente para 50 análisis) se suministra en 1 ml de solución salina tamponada con gelatina y azida sódica al 0,1 %. Contiene CD3 marcado con FITC (Leu-4), clon SK7,[7-10] para la identificación de linfocitos T, y Anti–HLA-DR marcado con PE, clon L243,[11] para la identificación de la población de linfocitos T activados HLA-DR$^+$CD3$^+$. La relación fluoresceína-proteína (F:P)

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

para los reactivos de anticuerpos monoclonales IgG de BD es de 2 a 5. La relación F:P para CD3 (Leu-4) FITC se ha optimizado para su uso previsto.

El anticuerpo CD3 (Leu-4) está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 de ratón y cadenas ligeras kappa. CD3 reacciona con la cadena épsilon del complejo CD3/receptor del antígeno de células T (TCR).[12] Este complejo está formado por al menos seis proteínas, con pesos moleculares entre 20 y 30 kilodaltons (kDa).[13] El antígeno reconocido por anticuerpos CD3 se asocia de forma no covalente a TCR α/β o γ/δ (70–90 kDa).[14]

El anticuerpo Anti–HLA-DR está formado por cadenas pesadas de IgG de $ratón_{2a}$ y cadenas ligeras kappa. El antígeno HLA-DR (antígeno leucocitario humano relacionado con el locus D) es una molécula del complejo de histocompatibilidad principal (CHP) humano de clase II. El antígeno es una glucoproteína transmembrana compuesta por subunidades α y β con pesos moleculares de 36 y 27 kDa, respectivamente.[11,15]

Precauciones

- Para uso diagnóstico in vitro.
- Cuando se almacena a una temperatura de 2–8 °C, el reactivo de anticuerpo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No se debe utilizar después de la fecha de caducidad.
- El reactivo de anticuerpo no se debe congelar ni exponer a la luz directa durante el almacenamiento o la incubación con células. Mantenga seco el vial del reactivo.
- Cualquier alteración en el aspecto del reactivo, como la precipitación o decoloración, es un indicio de inestabilidad o deterioro. En ese caso, no utilice el reactivo.
- El reactivo del anticuerpo contiene azida sódica como conservante. Sin embargo, es preciso extremar las precauciones para evitar la contaminación microbiana, que podría causar resultados erróneos.

ADVERTENCIA Se consideran de riesgo biológico todas las muestras biológicas y todos los materiales que hayan entrado en contacto con ellas. Manipular como si pudieran transmitir alguna infección[16,17] y desechar tomando las precauciones adecuadas según la normativa federal, estatal y local. Nunca pipetee con la boca. Utilice ropa protectora, protección ocular y guantes adecuados.

Las concentraciones se muestran en la tabla siguiente:

Reactivo	Concentración (µg/ml)
CD3 FITC	25,0
HLA-DR PE	3,1

5. INSTRUMENTO

El reactivo BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR está diseñado para utilizarse en un citómetro de flujo de BD que esté equipado con el hardware, el software y la electrónica de conmutación adecuados. El citómetro de flujo debe estar equipado para detectar fluorescencia de dos colores, dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC). Se recomienda utilizar el software BD Simulset™, versión 2.5 o posteriores, para la adquisición y el análisis de datos.

Todas las características de rendimiento se obtuvieron con un citómetro de flujo BD FACScan™ y se verificaron en un citómetro de flujo BD FACStrak™. Es posible que los demás sistemas tengan características distintas, por lo que el usuario deberá verificarlos.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Extraiga sangre asépticamente por venopunción[18,19] utilizando un BD Vacutainer® Blood Collection Tube de EDTA estéril. Para este procedimiento se necesita como mínimo 1 ml de sangre completa. Para obtener resultados óptimos, la sangre debe teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. La sangre con anticoagulante puede almacenarse a temperatura ambiente (20–25 °C) durante un máximo de 6 horas, hasta que esté lista para la tinción. Las muestras de sangre que se refrigeren antes de la tinción pueden arrojar resultados anómalos.

Deben hacerse un recuento de leucocitos y una fórmula leucocitaria a partir de la misma muestra de sangre completa antes de la tinción. Se considera aceptable un intervalo de concentración de leucocitos de $3,5 \times 10^3$ a $9,8 \times 10^3$ leucocitos/µl. Las muestras con hemogramas superiores a $9,8 \times 10^3$ leucocitos/µl deben diluirse con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X que contenga acida sódica al 0,1 %. Para muestras con recuentos inferiores a $3,5 \times 10^3$ leucocitos/µl podría ser necesaria más sangre, así como un procedimiento de separación para concentrar las células.

Condiciones que causan interferencias

No deben utilizarse muestras de pacientes previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre completa que se refrigeren antes de la tinción pueden arrojar resultados anómalos. Para obtener resultados óptimos, las muestras de sangre deben teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. Las muestras obtenidas de pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores pueden ofrecer una escasa diferenciación.[20] La presencia de blastocitos o de eritrocitos no lisados o nucleados puede interferir en los resultados del análisis. Las muestras hemolizadas deben rechazarse. Siga las indicaciones del fabricante del tubo de recogida para conocer cuál es el volumen mínimo de sangre que se debe recoger.

PRECAUCIÓN Tome las precauciones habituales al recoger, manipular y desechar todas las muestras de sangre humana y reactivos potencialmente cancerígenos.

7. PROCEDIMIENTO

Reactivo suministrado

Consulte Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis y Precauciones en la sección 4, Reactivo.

Reactivos y materiales necesarios que no se suministran

- Reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (CD45/CD14), 1 ml (n.º de catálogo 340040). Para determinar el área de selección de los análisis de linfocitos, consulte las instrucciones de uso de BD Simultest™ Leucogate™, el documento *BD Monoclonal Antibodies Source Book* (Manual de anticuerpos monoclonales de BD), sección 5.2, y el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™). Conserve a 2–8 °C.
- Reactivo BD Simultest™ Control γ_1/γ_{2a} (IgG_1 FITC/IgG_{2a} PE) (ambos específicos de hemocianina de lapa californiana), 1 ml (n.º de catálogo: 340041). Conserve a 2–8 °C.
- BD FACS™ Lysing Solution (10X), 100 ml (n.º de catálogo 349202). Conserve a 2–25 °C. Para usarlo, diluya a 1:10 con agua apta para reactivos a temperatura ambiente (20–25 °C). Conserve en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente. La solución preparada se mantendrá estable durante un mes a temperatura ambiente. Consulte las instrucciones de uso de BD FACS™ Lysing Solution.
- BD Calibrite™ Beads (n.º de catálogo 349502). Para obtener información de uso detallada, consulte las instrucciones de uso de BD Calibrite™ Beads.
- BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tubes o equivalentes.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

- Tubos de ensayo Falcon® desechables de poliestireno de 12 × 75 mm o equivalente.
- Agitador vorticial.
- Centrifugadora de baja velocidad (velocidad mínima 200 g) con rotor de cesto giratorio y soportes para tubos de 12 x 75 mm.
- Aspirador de vacío con depósito.
- Micropipeta con puntas.
- Tampón de lavado de PBS con azida sódica al 0,1 %.
- Solución fijadora (solución de paraformaldehído [PFA] al 1 % en PBS 1X con azida sódica al 0,1 %).

  Almacene a una temperatura de 2–8 °C en un recipiente de vidrio ámbar durante un máximo de 1 semana.
- BD FACSFlow™ Sheath Fluid (n.° de catálogo 342003) o equivalente.

  PRECAUCIÓN Utilice únicamente diluyente BD FACSFlow™ Sheath Fluid para diluir BD Calibrite™ Beads.
- Agua apta para reactivos (destilada y desionizada).

Tinción y fijación de las células

Las muestras de sangre completa se tiñen primero con los reactivos BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR (tubo C). Después de la tinción, se utiliza BD FACS™ Lysing Solution diluida (1X) para lisar los eritrocitos. Evite exponer los tubos a la luz directa. Realice el procedimiento a temperatura ambiente (20–25 °C) utilizando reactivos a temperatura ambiente. Consulte el punto Precauciones en la sección 4, Reactivo.

1. Para cada muestra de paciente, etiquete tres tubos A, B y C de 12 x 75 mm. Además, etiquete cada tubo con el número de identificación de la muestra.
2. Coloque 20 µl de reactivo BD Simultest™ Leucogate™ en el tubo A, 20 µl de reactivo BD Simultest™ Control en el tubo B y 20 µl de reactivo BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR en el tubo C.
3. Para cada tubo de muestra, utilice una punta de micropipeta nueva y añada con cuidado 100 µl de sangre completa con anticoagulante bien mezclada en el fondo de cada uno de los tres tubos etiquetados. La concentración de leucocitos recomendada es de 3,5 × 10^3 a 9,8 × 10^3 leucocitos/µl. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 15–30 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

   NOTA Proteja las muestras de la luz directa durante este procedimiento de incubación y tenga cuidado para evitar que se vierta sangre por el lateral del tubo. Si queda sangre completa en el lateral del tubo, no se teñirá con el reactivo.
4. Diluya BD FACS™ Lysing Solution (10X) a 1X siguiendo las instrucciones que figuran en el punto Reactivos y materiales necesarios que no se suministran de la sección 7, Procedimiento. Añada 2 ml de BD FACS™ Lysing Solution 1X a temperatura ambiente (20–25 °C) en cada tubo. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 10–12 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (20–25 °C). No incube durante más de 12 minutos.

   NOTA Evite la exposición prolongada de las células a los reactivos líticos, ya que podría provocar la destrucción de leucocitos.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

5. Inmediatamente después de la incubación, centrifugue los tubos a 300 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).
6. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.
7. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para resuspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 2 ml de PBS con azida sódica al 0,1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Centrifugue a 200 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).
8. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.
9. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para volver a suspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 0,5 ml de paraformaldehído al 1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Compruebe que las células estén bien mezcladas con la solución fijadora.
10. Las células ya están listas para analizarse en el citómetro de flujo. Tape o cubra los tubos preparados y almacénelos a una temperatura de 2–8 °C en un lugar oscuro hasta el momento del análisis por citometría de flujo. Analice las células fijadas en las 24 horas posteriores a la tinción. Agite a conciencia las células en el agitador vorticial (a baja velocidad) para reducir la agregación antes de procesarlas en el citómetro de flujo.[21]

Citometría de flujo

Siga las instrucciones de BD para el análisis por citometría de flujo bicolor.

Control de calidad

Para obtener resultados óptimos, se recomienda utilizar BD Calibrite™ Beads y el software AutoComp™ para configurar los voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT), ajustar la compensación de fluorescencia y verificar la sensibilidad del instrumento antes de usar el reactivo BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR en un citómetro de flujo BD FACScan™.

Se recomienda analizar diariamente una muestra de control de un sujeto adulto normal para optimizar los parámetros del instrumento y como comprobación de control de calidad del sistema. En la figura 1 se ilustran los resultados correctos para una muestra de paciente normal desde el punto de vista hematológico.

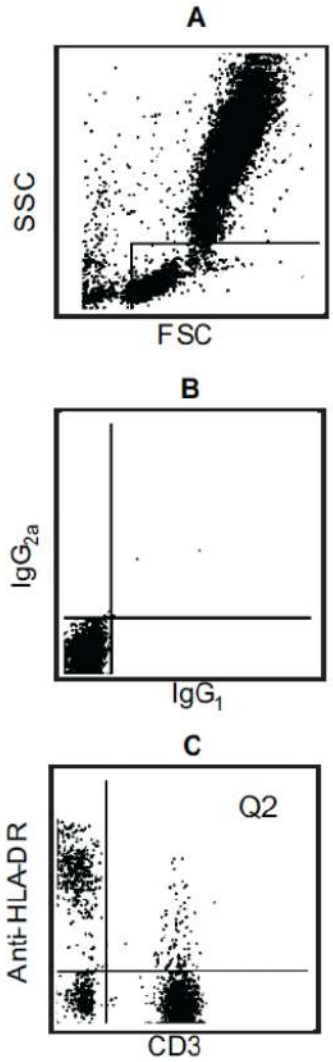
El reactivo BD Simultest™ Control se procesa con cada muestra de paciente para definir los marcadores de fluorescencia 1 (FL1) y fluorescencia 2 (FL2) entre grupos de linfocitos teñidos negativa y positivamente, así como para detectar la presencia de tinción inespecífica, que indicaría resultados erróneos del paciente.

Examine visualmente el gráfico de puntos correspondiente al tubo B del reactivo BD Simultest™ Control. Si el grupo negativo se muestra difuso y esparcido por el intervalo de intensidad de FL2, puede que el marcador no se haya ajustado correctamente y que los resultados no sean fiables.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Figura 1 Muestra de LWB de BD FACScan™, de un paciente normal desde el punto de vista hematológico, teñida con reactivos BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR (tubo-C).



ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

NOTA El reactivo BD Simultest™ Leucogate™ se utilizó para reducir los residuos, los monocitos y los granulocitos en el área de selección que se muestra para el tubo A. Se muestran gráficos de puntos con una comparación de FL1 (eje-X) frente a FL2 (eje-Y) para los tubos B y C.

El software BD Simulset™ examinará automáticamente los datos y alertará al operador mediante una serie de posibles mensajes de error. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para obtener una lista con los posibles mensajes. Utilice los criterios siguientes para el examen de los gráficos de puntos obtenidos para cada muestra con el fin de evaluar la calidad de los datos obtenidos.

- El operador debe rechazar los resultados si recibe uno o más de los mensajes de error siguientes para el control normal: no separation between cellular populations (no hay separación entre poblaciones celulares); too few lymphocytes (less than 500) (linfocitos demasiado escasos [menos de 500]); excessive

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

RBC or nucleated RBC contamination and debris (greater than 10%) (contaminación con eritrocitos excesivos o eritrocitos nucleados y residuos [superior al 10 %]); o excessive monocyte (greater than 3%) or granulocyte (greater than 6%) contamination of the lymphocyte gate (contaminación excesiva con monocitos [superior al 3 %] o granulocitos [superior al 6 %] del área de selección de linfocitos).

- Si no hay un motivo obvio para que falle el control normal, debe teñirse y procesarse una muestra de otro control normal y repetirse todo el proceso de tinción en todas las muestras siguientes.
- Las muestras con eritrocitos nucleados pueden contener un exceso de residuos debido a una lisis incompleta de estos con BD FACS™ Lysing Solution. El exceso de residuos puede suceder también cuando se analizan muestras de sangre de pacientes que padecen determinadas alteraciones hematológicas que dificultan la lisis de los eritrocitos, como mielofibrosis y esferocitosis. Los eritrocitos nucleados se contarán como residuos y, si estos superan el 10 %, el software marcará la muestra como «too many nonlymphs in gate» (demasiadas células distintas de linfocitos en el área de selección) y sus resultados deberán rechazarse.

8. RESULTADOS

Porcentaje de conversión de linfocitos

Cuando se realiza el cálculo del porcentaje de conversión de linfocitos, la subpoblación de linfocitos $CD3^+$ y $HLA\text{-}DR^+$ se informa como un porcentaje de los linfocitos incluidos en el área de selección para análisis de linfocitos. Si no se realiza el cálculo, los resultados se indican como un porcentaje de los eventos del área de selección.

Fórmula leucocitaria en tres partes

Para la sangre completa lisada, es posible calcular los monocitos, los linfocitos y los granulocitos como un porcentaje de los leucocitos utilizando el reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A). El software BD Simulset™ calcula automáticamente una fórmula leucocitaria en tres partes. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para obtener impresiones de datos representativos.

NOTA La fórmula leucocitaria proporcionada por el software BD Simulset™ debe utilizarse solamente para realizar una comparación con una fórmula leucocitaria independiente con fines de control de calidad y no debe sustituir a una fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente en las historias clínicas de los pacientes ni introducirse en el software BD Simulset™ para obtener recuentos absolutos.

Recuentos absolutos

Puede calcularse un hemograma completo si se obtiene un recuento de leucocitos y el porcentaje de linfocitos de una fórmula leucocitaria independiente mediante procedimientos de laboratorio estándar. Para obtener instrucciones sobre cómo calcular recuentos absolutos, consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™).

9. LIMITACIONES

- Es necesario que los laboratorios definan sus propios intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR que puedan verse afectados por el sexo o la edad del paciente, así como la técnica utilizada en la preparación. La raza del paciente también puede influir, aunque aún no se dispone de suficientes datos para respaldar esta afirmación. Es necesario conocer la edad, el sexo, el estado clínico y la raza de los sujetos a la hora de determinar un intervalo de referencia.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

- Los resultados del reactivo BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR deben utilizarse junto con otra información obtenida de la evaluación clínica y procedimientos de diagnóstico independientes adicionales.
- El reactivo BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR no está diseñado para la discriminación de muestras por la presencia de células leucémicas ni para utilizarse en muestras fenotípicas de pacientes con leucemia. La presencia de blastocitos podría impedir que el reactivo BD Simultest™ Leucogate™ defina un área de selección de análisis de linfocitos adecuada. El software marcará la muestra y no se imprimirán los resultados.
- Los valores del hemograma completo de las subpoblaciones de linfocitos podrían no ser comparables entre laboratorios debido a las variaciones en los métodos de determinación de los hemogramas de leucocitos y/o valores de las fórmulas leucocitarias.

10. VALORES ESPERADOS

Subpoblaciones de leucocitos

La población de linfocitos T activados presente en el cuadrante 2 (C2) del tubo C se muestra en la figura 1 y en el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™). Los resultados clínicamente significativos se encuentran en el informe del médico.

BD ha investigado los intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR en sujetos masculinos y femeninos normales mediante el citómetro de flujo BD FACScan™ en seis centros (cinco centros clínicos europeos y un centro de EE. UU.). Los intervalos de referencia normales previstos para linfocitos T activados para LWB se muestran en la tabla 1.[22]

Tabla 1 Intervalos de referencia representativos para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR en adultos normales desde el punto de vista hematológico como porcentajes de los linfocitos del área de selección totales (convertidos) (datos agrupados de seis centros clínicos)

Parámetro	Sexo	Edad	n	Media (%)	Intervalo del 95 %
Linfocitos T activados	Masculino	18–40	58	9,4	3,5–20,6
	Masculino	41–70	67	11,0	3,6–25,9
	Femenino	18–40	64	7,8	2,8–17,3
	Femenino	40–70	44	9,1	4,2–17,2

No se deben utilizar los intervalos de referencia para adultos con muestras de sangre de pacientes pediátricos.

La raza también puede ser una variable en la definición de los intervalos de referencia normales,[23] aunque BD no ha recopilado datos suficientes para determinarlo.

NOTA Los valores normales previstos pueden variar según la edad, el sexo o la raza del paciente. Debido a estas diferencias, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia normal para cada parámetro.

11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El rendimiento del reactivo BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR se estableció mediante análisis en los laboratorios de BD Biosciences en San Jose (California) y/o en uno o varios centros clínicos más.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Reproducibilidad intramuestral

En la tabla 2 se muestra la reproducibilidad intramuestral media obtenida tanto para sujetos normales como para sujetos anómalos.

Tabla 2 Reproducibilidad intramuestral para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR (cinco sujetos normales y cinco sujetos anómalos) como porcentajes de linfocitos (convertidos)

Sujetos	Parámetro	Media	DE[a]	CV[b]	df[c]
Normales	Linfocitos T activados	6,4	1,5	24,5	15
Anómalos	Linfocitos T activados	38,9	1,6	4,3	15

a. DE = desviación estándar

b. CV = coeficiente de variación

c. df = grados de libertad

Reproducibilidad interinstrumental

En la tabla 3 se muestran los resultados de la reproducibilidad interinstrumental.

Tabla 3 Reproducibilidad interinstrumental para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR (diez sujetos normales y tres instrumentos) como porcentajes de linfocitos (convertidos)

Parámetro	Media	DE	CV	df
Linfocitos T activados	11,8	1,56	14,09	20

Reproducibilidad entre laboratorios

La reproducibilidad entre laboratorios se indica mediante la capacidad para agrupar los intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/Anti–HLA-DR (consulte la tabla 1).

Reactivo CD3/Anti–HLA-DR frente al método comparativo

En la tabla 4 se presenta un resumen de los resultados.

Tabla 4 Reactivo BD Simultest™ IMK Plus frente al método comparativo[a] utilizando LWB y un citómetro de flujo BD FACScan™

Parámetro	Pendiente	Intersección	r	n[b]	Intervalo de datos (%)
Linfocitos T activados	1,06	0,34	0,92	27	4–51

a. En comparación con BD Simultest™ Immune Monitoring Kit.

b. Compuesto por muestras normales y anómalas.

Estabilidad de las preparaciones celulares teñidas

Se recomienda analizar las muestras en las 24 horas siguientes a la tinción.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

Reactividad cruzada

El anticuerpo Anti–HLA-DR reacciona con monocitos/macrófagos, linfocitos citolíticos naturales activados, células progenitoras humanas y linfocitos B, así como con linfocitos T activados.[2,4,24-27]

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Linealidad-recuperación

Se espera que los resultados sean lineales entre 3,5 × 10^3 y 9,8 × 10^3 leucocitos/µl.

GARANTÍA

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

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

REFERENCIAS

1. Legendre C, Schiffrin A, Weitzner G, Colle E, Guttmann R. Two color flow cytometry analysis of activated T-lymphocyte subsets in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes*. 1988;37:792-795.
2. Tomkinson BE, Wagner DK, Nelson DL, Sullivan JL. Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection. *J Immunol*. 1987;139:3802-3807.
3. Bogner J, Matuschke B, Hienrich B, Schreiber M, Nerl C, Goebel F. Expansion of activated T lymphocytes (CD3+HLA-DR+) detectable in early stages of HIV-1 infection. *Klin Wochenschr*. 1990;68:393-396.
4. Levacher M, Tallet S, Dazza M, Dournon E, Rouveix B, Pocidalo JJ. T activation marker evaluation in ARC patients treated with AZT: comparison with CD4+ lymphocyte count in non-progressors and progressors towards AIDS. *Clin Exp Immunol*. 1990;81:177-182.
5. Vanham G, Kestens L, Gigase P, et al. Evidence for circulating activated cytotoxic T cells in HIV-infected subjects before the onset of opportunistic infections. *Clin Exp Immunol*. 1990;82:3-9.
6. Bishop G, Hall B, Duggin G, Horvath J, Sheil A, Tiller D. Immunopathology of renal allograft rejection analyzed with monoclonal antibodies to mononuclear cell markers. *Kidney Internat*. 1986;29:708-717.
7. Haynes BF. Summary of T-cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes.* Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
8. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and T-cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med*. 1981;153:310-323.
9. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti–Leu-4 antibody. *J Immunol*. 1983;131:536-539.
10. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes.* Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:259-288.
11. Lampson LA, Levy R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol*. 1980;125:293-299.
12. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood*. 1988;71:603-612.
13. Brenner MB, Groh V, Porcelli SA, et al. Structure and distribution of the human γ/δ T-cell receptor. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:1049-1053.
14. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:629-662.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Copyright

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

15. Brodsky FM. A matrix approach to human class II histocompatibility antigens: reactions of four monoclonal antibodies with the products of nine haplotypes. *Immunogenetics*. 1984;19:179-194.
16. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
17. Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html. Accessed March 12, 2019.
18. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document GP41-A6.
19. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
20. Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
21. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
22. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
23. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol*. 1985;3:33-37.
24. Stites DP, Casavant CH, McHugh TM, et al. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence. *Clin Immunol Immunopathol*. 1986;38:161-177.
25. Terstappen LW, Hollander Z, Meiners H, Loken MR. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leuk Biol*. 1990;48:138-148.
26. Warnke RA, Levy R. Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem*. 1980;28:771-776.
27. Edwards J, Durant B, Jones D, Evans P, Smith J. Differential expression of HLA Class II antigens in fetal human spleen: Relationship of HLA-DP, DQ, and DR to immunoglobulin expression. *J Immunol*. 1985;137:479-490.

PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

Para conocer las patentes de EE. UU. que pueden aplicarse, consulte bd.com/patents.

BD, el logotipo de BD, BD FACSFlow, BD FACStrak, BD Simulset, Calibrite, FACS, FACScan, Leucogate, Simultest y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company o de sus empresas afiliadas. Las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios. © 2023 BD. Todos los derechos reservados.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

Glosario de símbolos

Remítase al etiquetado del producto para consultar los símbolos aplicables.

Símbolo	Significado
	Fabricante
EC REP	Representante autorizado en la Unión Europea
CH REP	Representante autorizado en Suiza
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
SN	Número de serie
STERILE	Estéril
STERILE A	Esterilizado utilizando técnicas de procesado asépticas
STERILE EO	Esterilizado utilizando óxido de etileno
STERILE R	Esterilizado utilizando radiación
STERILE	Esterilizado utilizando vapor de agua o calor seco
	No volver a esterilizar
	No estéril
	No utilizar si el envase está dañado y consúltense las *instrucciones de uso*
	Vía fluida estéril
	Vía fluida estéril (óxido de etileno)
	Vía fluida estéril (irradiación)
	Frágil, manejar con cuidado
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Manténgase seco
	Límite inferior de temperatura
	Límite superior de temperatura
	Límite de temperatura
	Limitación de humedad
	Riesgos biológicos
	No reutilizar
	Consúltense las *instrucciones de uso* o consúltense las *instrucciones de uso* electrónicas
	Precaución
LATEX	Contenido o presencia de látex de caucho natural
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
CONTROL -	Control negativo
CONTROL +	Control positivo
Σ	Contenido suficiente para <*n*> pruebas
	Sólo para la evaluación del funcionamiento en diagnóstico in vitro
	Apirógeno
#	Número de paciente
	Este lado hacia arriba
	No apilar

Símbolo	Significado
	Sistema de barrera estéril única
PHT DEHP BBP	Contenido o presencia de ftalato: combinación de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y butilbenciftalato (BBP)
	Recoger por separado Indica la recogida por separado obligatoria de los residuos de aparatos eléctricos y electrónicos.
CE	Marcado CE; significa que cumple con la especificación técnica europea
	Prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente
	Producto para autodiagnóstico
Rx Only	Esto solo se aplica a EE. UU.: «Precaución: La ley federal estadounidense impone restricciones sobre este dispositivo, cuya venta debe ser realizada por un médico o por orden de este».
CC	País de fabricación «CC» debe sustituirse por el código de país de dos o tres letras.
	Hora de recogida
	Cortar
	Despegar por aquí
	Fecha de recogida
	Manténgase fuera de la luz
H_2	Se produce gas de hidrógeno
	Perforación
	Número de secuencia del panel de inicio
	Número de secuencia del panel final
	Número de secuencia interno
/	<n.º de envase>/<total de envases>
MD	Producto sanitario
	Contiene sustancias peligrosas
	Marca de conformidad ucraniana
FC	Cumple los requisitos de la FCC conforme a 21 CFR, parte 15
c UL us	Certificación de producto UL para EE. UU. y Canadá
UDI	Identificador único de dispositivo
	Importador
	Colocar la etiqueta del paciente únicamente en el área enmarcada
MR	Compatible con la resonancia magnética (RM)
MR	Compatibilidad condicional con la resonancia magnética (RM)
MR	Incompatible con la resonancia magnética (RM)
For use with	Para uso con
This Product Contains Dry Natural Rubber	Este producto contiene goma natural seca
For Export Only	Solo para exportación
Instruments	Instrumentos

Nota: La disposición del texto en los símbolos viene determinada por el diseño de la etiqueta.

L006715(08) 2023-03

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15648
Capacitación

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
155 North McCarthy Boulevard
Milpitas, California 95035 USA

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Road
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Limited
14B George Bourke Drive
Mt. Wellington Auckland 1060
New Zealand

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite bdbiosciences.com.

ClinicalApplications@bd.com

eifu.bd.com

HISTORIAL

Revisión	Fecha	Cambios realizados
23-2651(04)	2023-08	Se ha actualizado la dirección legal del fabricante. Se ha actualizado el glosario de símbolos. Se ha añadido la sección «Historial». Se ha actualizado la sección «Patentes y marcas comerciales». Se ha añadido el símbolo «Rx Only» utilizado bajo prescripción. Se ha actualizado la sección «Reactivos y materiales necesarios que no se suministran».

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

BD Simultest™ IgG_1/IgG_{2a}

50 análisis, n.º de catálogo 340041

23-3298(03)
2023-08
Español

℞ Only IVD

1. USO PREVISTO

El BD Simultest™ Control γ_1/γ_{2a} (IgG_1 FITC/IgG_{2a} PE) es un reactivo de inmunofluorescencia directa de dos colores que se utiliza como un control negativo en el inmunofenotipaje mediante citometría de flujo de sangre completa con eritrocitos lisados (LWB). El BD Simultest™ Control γ_1/γ_{2a} se utiliza con el software BD Simulset™ para definir los marcadores de cuadrante de fluorescencia 1 (FL1) y fluorescencia 2 (FL2) alrededor de la población de linfocitos no teñida (negativos), así como para evaluar el grado de unión de anticuerpos inespecífica de antígenos (tinción inespecífica) presente, especialmente aquella causada por receptores Fc. BD Simultest™ Control γ_1/γ_{2a} está destinado a uso diagnóstico in vitro con reactivos de diagnóstico in vitro BD Simultest™.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Dos procedimientos fundamentales para la realización del inmunofenotipaje de linfocitos humanos con análisis por citometría de flujo son (1) la definición de los marcadores de fluorescencia para establecer un límite entre los eventos de leucocitos teñidos negativa y positivamente y (2) la evaluación de la tinción inespecífica.[1]

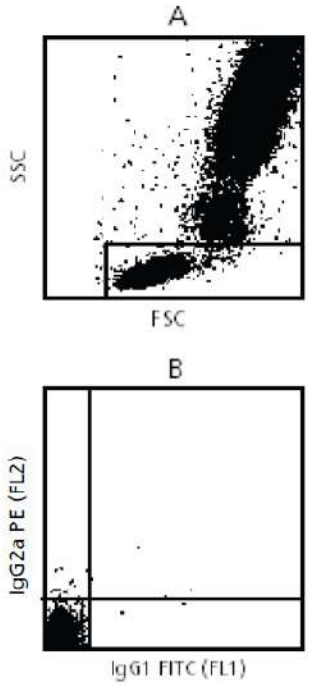
Tras la utilización del reactivo BD Simultest™ Leucogate™ con el software BD Simulset™ para crear un área de selección para análisis de linfocitos, se utiliza el reactivo BD Simultest™ Control junto con el software BD Simulset™ para analizar los eventos incluidos en el área de selección en función de la distribución de fluorescencia mediante el ajuste de marcadores para los cuadrantes de fluorescencia y la estimación de la tinción inespecífica.

BD Simultest™ Control se utiliza con el software BD Simulset™ para dividir los eventos en el eje X de FL1 frente al eje Y de FL2 en cuatro cuadrantes que caracterizan las células en función de las propiedades siguientes: cuadrante 1 (C1) (superior izquierdo), tinción inespecífica positiva para PE; cuadrante 2 (C2) (superior derecho), tinción inespecífica positiva para PE y FITC; cuadrante 3 (C3) (inferior izquierdo), negativo para PE y FITC sin teñir; y cuadrante 4 (C4) (inferior derecho), tinción inespecífica positiva para FITC. Los eventos incluidos en cualquier cuadrante distinto de C3 son indicativos de tinción inespecífica. En la figura 1 se muestran los marcadores de cuadrante que indican los límites de inmunofluorescencia de fondo y positiva de una muestra de paciente normal desde el punto de vista hematológico.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Figura 1 Muestra de LWB de BD FACScan™ de un paciente hematológicamente normal teñida con los reactivos BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A) y BD Simultest™ Control (tubo B).



ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

NOTA BD Leucogate™ se utilizó para reducir los residuos, monocitos y granulocitos en el área de selección que se muestra para el tubo A. Se muestran gráficos de puntos de FL1 (eje X) frente a FL2 (eje Y) para el tubo B.

El reactivo BD Simultest™ Control contiene anticuerpos monoclonales de múrido marcados con FITC y PE que reaccionan específicamente con la hemocianina de lapa californiana (KLH), un antígeno no presente en los leucocitos humanos. Por tanto, cuando se añaden a sangre humana completa, los anticuerpos de control no se unen específicamente a los antígenos de la superficie de los leucocitos humanos. Sin embargo, los anticuerpos de múrido pueden unirse a los leucocitos humanos a través de medios no específicos de antígenos, principalmente por interacción del receptor Fc del leucocito con la región Fc del anticuerpo.[2,3] Esta unión inespecífica de anticuerpos monoclonales a través de los receptores Fc de la membrana superficial puede crear dificultades significativas a la hora de determinar reacciones positivas verdaderas.[2,3] Mediante la presentación de la unión de anticuerpos de múrido con leucocitos humanos a través de medios no específicos de antígenos (relacionados con el receptor Fc), el control establece el límite entre las poblaciones fluorescentes negativas y positivas,[4] así como la fluorescencia de fondo prevista como resultado de la tinción inespecífica.[4-6]

BD Simulset™ utiliza el área de selección de linfocitos determinada con el tubo de BD Leucogate™, así como los marcadores de fluorescencia y los límites de tinción inespecífica determinados con el tubo de control, para analizar los tubos de BD Simultest™ posteriores.

Para obtener información adicional acerca de la definición del área de selección de linfocitos, consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™). Para obtener información adicional y una descripción general del inmunofenotipaje de linfocitos humanos, consulte la sección 2, Resumen y explicación, en las instrucciones de uso específicas del reactivo de inmunofenotipaje de diagnóstico in vitro de BD.

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El reactivo BD Leucogate™ se añade al primer tubo de muestra de sangre completa del paciente para determinar, mediante el software BD Simulset™, la configuración del área de selección de linfocitos. El reactivo BD Simultest™ Control se añade al segundo tubo de muestra de sangre completa del paciente para determinar, con el software BD Simulset™, la configuración de los marcadores de fluorescencia. El inmunofenotipaje de linfocitos se realiza mediante el uso de reactivos BD Simultest™ en el tercer tubo de muestra de sangre completa del paciente y los siguientes, basándose en los parámetros determinados por los tubos de muestra de BD Leucogate™ y de control. A continuación, los tubos de muestra de los reactivos BD Leucogate™, BD Simultest™ Control y BD Simultest™ se tratan con BD FACS™ Lysing Solution para lisar, lavar y fijar los eritrocitos antes de realizar el análisis por citometría de flujo.

Una muestra parcial (alícuota) del paciente teñida se introduce en el citómetro de flujo y pasa en una estrecha corriente a través del trayecto de un haz de láser. Las células teñidas emiten fluorescencia al ser excitadas por el haz del láser, y la luz emitida es recogida y procesada por el citómetro de flujo. El uso de dos fluorocromos permite un análisis bicolor simultáneo, puesto que cada fluorocromo emite luz a una longitud de onda diferente cuando es excitado a 488 nm por un láser de iones de argón. Los linfocitos teñidos con FITC emiten luz de color amarillo verdoso (emisión máxima aproximada de 515 nm), mientras que los linfocitos teñidos con PE emiten luz de color rojo anaranjado (emisión máxima aproximada de 580 nm).

Las células interactúan también con el haz del láser dispersando la luz. La luz de dispersión frontal (FSC) da una medida del tamaño de las células, mientras que la luz de dispersión lateral (SSC) es una indicación de la granularidad celular. El citómetro de flujo BD FACScan™ utilizado con el software BD Simulset™ cuenta un número de células suficiente para garantizar que en el área de selección de análisis se incluyan un mínimo de 2000 linfocitos. Los datos deben guardarse como archivos en modo de lista a los que se deben asignar nombres lógicos que ayuden a recuperar dichos datos para realizar análisis posteriores o repetir los análisis mediante el software BD Simulset™.

BD Simultest™ Control se utiliza con el software BD Simulset™ para definir los marcadores de fluorescencia 1 (FL1) y fluorescencia 2 (FL2) alrededor de la población de linfocitos no teñida, así como para evaluar el grado de tinción inespecífica presente, especialmente aquella causada por receptores Fc. Cuando más del 5 % de los eventos de control se encuentre por encima de los marcadores de control negativo de FL1 o FL2, se mostrará un mensaje de error "too much nonspecific staining" (demasiada tinción inespecífica) en la pantalla del ordenador y en la impresión del laboratorio para el tubo de control. Durante el procesamiento del tubo de control por parte del software, el operador debe comprobar si aparecen mensajes de error que indiquen la presencia de tinción inespecífica.

Para cada muestra de paciente, el área de selección de linfocitos definida con BD Leucogate™ y los marcadores de fluorescencia determinados mediante el uso de BD Simultest™ Control se emplean para analizar las muestras de pacientes teñidas con los reactivos BD Simultest™. Los resultados del inmunofenotipaje pueden expresarse como porcentajes de linfocitos incluidos en el área de selección o como porcentajes de eventos totales en el área de selección. Si se selecciona la opción Percent Lymphocyte Conversion (Porcentaje de conversión de linfocitos) en el Main Menu (menú principal) del software BD Simulset™, este resta las células que no son linfocitos (monocitos, granulocitos y residuos) del cuadrante 3 (C3) y, a continuación, notifica los resultados en forma de porcentaje de linfocitos positivos en el área de selección. Si no se selecciona esta opción del software, los resultados se expresarán como porcentajes de los eventos totales del área de selección.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

4. REACTIVO

Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis

BD Simultest™ Control IgG_1/IgG_{2a} es una combinación de dos anticuerpos monoclonales de múrido, uno de ellos conjugado con FITC y el otro con PE. El reactivo, suficiente para 50 análisis, se suministra en 1,0 ml de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) que contiene gelatina y acida sódica al 0,1 %. Contiene IgG_1 marcada con FITC, clon X40, e IgG_{2a} marcada con PE, clon X39. Tanto el clon X40 como el clon X39 reaccionan específicamente a KLH, un antígeno no expresado en células ni en estirpes celulares humanas. Los clones X40 y X39 se obtienen de la hibridación de células de mieloma Sp2/0-Ag14 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con KLH. El clon X40 está formado por cadenas pesadas de IgG_1 de ratón y cadenas ligeras kappa, mientras que el clon X39 está formado por cadenas pesadas de IgG_{2a} de ratón y cadenas ligeras kappa. La relación fluoresceína-proteína (F:P) para BD Simultest™ Control es de 3 a 5. La relación F:P para cada reactivo se ha optimizado para su uso previsto.

Precauciones

- BD Simultest™ Control IgG_1/IgG_{2a} está destinado a uso diagnóstico in vitro con reactivos de diagnóstico in vitro BD Simultest™.
- Cuando se almacenan a una temperatura de 2–8 °C, los reactivos de anticuerpos se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No se debe utilizar después de la fecha de caducidad.
- El reactivo de anticuerpo no se debe congelar ni exponer a la luz directa durante el almacenamiento o la incubación con células.
- Si se utilizan temperaturas o tiempos de incubación o centrifugación distintos de los especificados, pueden producirse errores.
- Para obtener resultados óptimos, tiña las muestras de sangre en las 6 horas siguientes a la venopunción.
- Cualquier alteración en el aspecto del reactivo, como la precipitación o decoloración, es un indicio de inestabilidad o deterioro. En ese caso, no utilice el reactivo.
- Los reactivos de anticuerpos contienen azida sódica como conservante; Sin embargo, es preciso extremar las precauciones para evitar la contaminación microbiana, que podría causar resultados erróneos.

  ADVERTENCIA Se consideran de riesgo biológico todas las muestras biológicas y todos los materiales que hayan entrado en contacto con ellas. Manipular como si pudieran transmitir alguna infección[7,8] y desechar tomando las precauciones adecuadas según la normativa federal, estatal y local. Nunca pipetee con la boca. Utilice ropa protectora, protección ocular y guantes adecuados.

Las concentraciones se muestran en la tabla siguiente:

Reactivo	Concentración (µg/ml)
IgG_1 FITC	12,5
IgG_{2a} PE	12,5

5. INSTRUMENTO

BD Simultest™ Control IgG_1/IgG_{2a} está diseñado para utilizarse en un citómetro de flujo de BD que esté equipado con el hardware, el software y la electrónica de conmutación informáticos adecuados. El

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 16643
Apoderado
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

citómetro de flujo debe estar equipado para detectar fluorescencia bicolor, dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC).

Para ello se recomienda utilizar los siguientes sistemas de instrumento.

- Sistema de citómetro de flujo BD FACScan™ equipado para detección de fluorescencia bicolor y detección de dispersión de la luz de dos parámetros. Para obtener información de uso detallada, consulte el documento *BD FACScan™ User's Guide* (Guía del usuario de BD FACScan™).
- Sistema informático BD CONSORT™ 30 o BD CONSORT™ 32 y periféricos (incluidos en el sistema BD FACScan™). Para obtener información de uso detallada, consulte el documento *BD CONSORT™ 30 Software User's Guide* (Guía de usuario del software BD CONSORT™ 30) o *BD CONSORT™ 32 System User's Guide* (Guía de usuario del sistema BD CONSORT™32).
- Software BD Simulset™. Para obtener información de uso detallada, consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™).
- BD Calibrite™ Beads (n.º de catálogo 349502). Estas microesferas se utilizan para configurar los voltajes de tubo fotomultiplicador (PMT), ajustar la compensación de fluorescencia y verificar la sensibilidad del instrumento en el citómetro de flujo BD FACScan™. Para obtener información de uso detallada, consulte las instrucciones de uso de BD Calibrite™ Beads.
- Software BD FACSComp™. Para obtener información de uso detallada, consulte el documento *BD FACSComp™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD FACSComp™).

Todas las características de rendimiento se obtuvieron con los sistemas de instrumento citados arriba. Otros sistemas pueden tener características diferentes.

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Recoja sangre asépticamente por venopunción[4,9] utilizando un BD Vacutainer® Blood Collection Tube de EDTA estéril. Para este procedimiento se necesita como mínimo 1 ml de sangre completa. Para obtener resultados óptimos, la sangre debe teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. La sangre con anticoagulante puede almacenarse a temperatura ambiente (20–25 °C) durante un máximo de 6 horas, hasta que esté lista para la tinción. Las muestras de sangre que se refrigeren antes de la tinción pueden arrojar resultados anómalos.

Deben hacerse un hemograma de leucocitos y una fórmula leucocitaria a partir de la misma muestra de sangre completa antes de la tinción. BD Simultest Control IgG_1/IgG_{2a} puede utilizarse en muestras con hemogramas de leucocitos que estén dentro del intervalo aceptable de cualquier reactivo de diagnóstico in vitro de BD Simultest™. Consulte las instrucciones de uso del reactivo BD Simultest™ específico para ver el rango aceptable del reactivo empleado para el fenotipaje.

Condiciones que causan interferencias

No deben utilizarse células previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre completa que se refrigeren antes de la tinción pueden arrojar resultados anómalos. Las muestras obtenidas de pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores pueden ofrecer una escasa diferenciación.[10] La presencia de blastocitos anómalos o de eritrocitos no lisados o nucleados puede interferir en los resultados del análisis. Deben rechazarse las muestras hemolizadas o las muestras con menos de 1 ml de sangre completa en el tubo de recogida.

PRECAUCIÓN Tome las precauciones habituales al recoger, manipular y desechar todas las muestras de sangre humana y reactivos potencialmente cancerígenos.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

7. PROCEDIMIENTO

Reactivo suministrado

Consulte Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis y Precauciones en la sección 4, Reactivo.

Reactivos y materiales necesarios que no se suministran

- BD Simultest™ Leucogate (CD45/CD14), 1.0 ml (n.º de catálogo 340040). Para obtener información acerca de la determinación de un área de adquisición de linfocitos, consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™). Conserve a 2–8 °C.
- BD FACS™ Lysing Solution (10X), 100 ml (n.º de catálogo 349202). Conserve a 2–25 °C. Para usarlo, diluya a 1:10 con agua apta para reactivos a temperatura ambiente (20–25 °C). Conserve en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente. La solución preparada se mantendrá estable durante un mes a temperatura ambiente. Consulte las instrucciones de uso de BD FACS™ Lysing Solution.

  ADVERTENCIA La BD FACS™ Lysing Solution contiene menos del 50 % de dietilenglicol y menos del 15 % de formaldehído.
- BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tubes o equivalentes.
- Tubos de ensayo Falcon® desechables de poliestireno de 12 × 75 mm o equivalente.
- Agitador vorticial.
- Centrífuga de baja velocidad (200 *g*) con rotor de cesto giratorio y soportes para tubos de 12 × 75 mm.
- Aspirador de vacío con depósito.
- Micropipeta con puntas.
- Tampón de lavado de PBS con azida sódica al 0,1 %.
- Solución fijadora (solución de paraformaldehído [PFA] al 1 % en PBS 1X con azida sódica al 0,1 %).

  Almacene a una temperatura de 2–8 °C en un recipiente de vidrio ámbar durante un máximo de 1 semana.
- BD FACSFlow™ Sheath Fluid (n.º de catálogo 342003) o equivalente.

  PRECAUCIÓN Utilice únicamente diluyente BD FACSFlow™ Sheath Fluid para diluir BD Calibrite™ Beads.
- Agua apta para reactivos (destilada y desionizada).

Tinción y fijación de las células

Las muestras de sangre completa se tiñen primero con BD Leucogate™ (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y el reactivo BD Simultest™ apropiado (tubo C), (así como cualquier otro reactivo del panel en tubos adicionales). Después de la tinción, se utiliza BD FACS™ Lysing Solution diluida (1X) para lisar los eritrocitos. Consulte la sección 6, Recogida y preparación de muestras. Realice el procedimiento a temperatura ambiente (20–25 °C) utilizando reactivos a temperatura ambiente. Después las muestras deben lavarse y fijarse. Consulte Precauciones en la sección 4, Reactivo.

1. Para cada muestra de paciente, etiquete tres tubos de 12 × 75 mm, A, B y C. Si hay otros reactivos en el panel, etiquete más tubos según sea necesario. Etiquete cada tubo también con el número de identificación de la muestra.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

2. Ponga 20 µl de reactivo BD Simultest™ Leucogate™ en el tubo A, 20 µl de BD Simultest™ Control en el tubo B, 20 µl del reactivo de inmunofenotipaje apropiado en el tubo C y 20 µl de cada reactivo de inmunofenotipaje adicional del panel en tubos separados, según sea necesario.

3. Para cada tubo de muestra del paciente, utilice una punta de micropipeta nueva y añada con cuidado 100 µl de la muestra de sangre completa del paciente con anticoagulante y bien mezclada a la concentración correcta en el fondo de cada uno de los tubos etiquetados. Tenga cuidado para evitar que se vierta sangre por el lateral del tubo. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 15–30 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

   NOTA Proteja las muestras de la luz directa durante este procedimiento de incubación y tenga cuidado para evitar que se vierta sangre por el lateral del tubo. Si queda sangre completa en la pared del tubo, puede que no se tiña con el reactivo.

4. Añada 2 ml de BD FACS™ Lysing Solution 1X a temperatura ambiente (20–25 °C) en cada tubo. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 10 a 12 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente. No incube durante más de 12 minutos.

   NOTA Evite la exposición prolongada de las células a los reactivos con eritrocitos lisados, ya que podría provocar la destrucción de leucocitos.

5. Inmediatamente después de la incubación, centrifugue los tubos a 300 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

6. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.

7. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para resuspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 2 ml de PBS con azida sódica al 0,1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Centrifugue a 200 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

8. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.

9. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para volver a suspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 0,5 ml de paraformaldehído al 1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Compruebe que las células estén bien mezcladas con la solución fijadora.

10. Las células ya están listas para analizarse en el citómetro de flujo. Tape o cubra los tubos preparados y almacénelos a una temperatura de 2–8 °C en un lugar oscuro hasta el momento del análisis por citometría de flujo. Analice las células fijadas en las 24 horas posteriores a la tinción. Agite a conciencia las células en el agitador vorticial (a baja velocidad) antes de colocarlas en el citómetro de flujo para ayudar a reducir la agregación.

Citometría de flujo

Siga las instrucciones de BD para el análisis por citometría de flujo bicolor y consulte la sección 5, Instrumento. Se recomienda utilizar el método general siguiente.

El citómetro de flujo BD FACScan™ se prepara en primer lugar para el análisis de la muestra utilizando BD Calibrite™ Beads y el software BD FACSComp™. Los tubos de muestras teñidas se procesan después en el citómetro de flujo y se analizan con el software BD Simulset™. Consulte el documento *BD FACScan™ User's*

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 10000

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

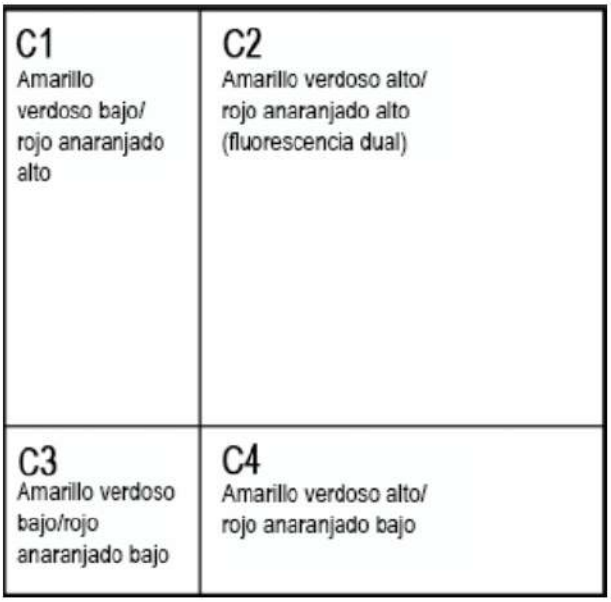
Guide (Guía del usuario de BD FACScan™), las instrucciones de uso de *BD Calibrite™ Beads*, el documento *BD FACSComp™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD FACSComp™) y el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para ver instrucciones de uso detalladas. Es aconsejable guardar los datos del paciente en modo de lista para permitir posteriores análisis de los archivos de datos.

Consulte las instrucciones de uso del reactivo BD Simultest™ de diagnóstico in vitro específico para ver más instrucciones.

El tubo de BD Simultest™ Control (B) se utiliza para definir los marcadores del cuadrante de intensidad de fluorescencia. El software BD Simulset™ utiliza automáticamente el área de selección de linfocitos definida con BD Leucogate™ y luego establece los marcadores FL1 y FL2. Los marcadores de fluorescencia deben ajustarse alrededor de la población negativa que se muestra como el grupo de eventos bajos tanto en fluorescencia amarilla verdosa como roja anaranjada.

El software cuenta el número de eventos que hay en cada cuadrante y luego calcula un porcentaje de eventos de linfocitos positivos para C1 (amarillo verdoso bajo/rojo anaranjado alto), C2 (amarillo verdoso alto/rojo anaranjado alto, o fluorescencia dual), C3 (amarillo verdoso bajo/rojo anaranjado bajo) y C4 (amarillo verdoso alto/rojo anaranjado bajo) (consulte la figura 2).

Figura 2 Los cuadrantes de la pantalla de fluorescencia y los colores correspondientes se indican como C1 a C4.



Control de calidad

Consulte la sección Control de calidad de las instrucciones de uso del reactivo BD Simultest™ de diagnóstico in vitro específico.

El BD Simultest™ Control se procesa con cada muestra de paciente para definir los marcadores de FL1 y FL2 entre los eventos teñidos positivamente y los no teñidos del área de selección de linfocitos, así como para detectar la presencia de tinción inespecífica, que indicaría resultados erróneos del paciente.

Una vez definidos los marcadores, si más del 5 % de los hemogramas totales para el tubo B se encuentran en C1, C2 o C4, se sospecha que hay tinción inespecífica. El software lo notifica al operador con un mensaje

ESTEBAN ZORZOLI
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

«too much nonspecific staining» (demasiada tinción inespecífica). En este caso, los resultados para el tubo C y los tubos adicionales del panel de reactivos deben considerarse no fiables.

Si se observa una separación escasa entre los grupos negativo y positivo en el examen visual de los gráficos de puntos, puede deducirse que hay tinción inespecífica y deberá rechazarse el procesamiento. La tinción inespecífica puede deberse a un mal estado de las células.

Consulte la sección Solución de problemas si observa tinción inespecífica.

8. RESULTADOS

Unión de anticuerpos inespecífica de antígenos (tinción inespecífica)

Los eventos incluidos en el cuadrante C1 tienen solamente fluorescencia FL2, los del C4 solamente fluorescencia FL1 y los del C2 tienen tanto fluorescencia FL1 como FL2. Los eventos de los cuadrantes C1, C2 y C4 son una medida de la tinción inespecífica (consulte la tabla 1 y la figura 1). Los eventos incluidos en el cuadrante C3 tienen fluorescencia baja en FL1 (FITC) y FL2 (PE). Los eventos incluidos en el cuadrante C3 son una medida de los linfocitos no teñidos y de las células distintas de linfocitos contaminantes que hay en el área de selección.

Tabla 1 Resumen de datos de la figura 1 y cuadrantes utilizados para calcular subpoblaciones

Tubo	Tipo de célula	Cuadrante	% de linfocitos (convertidos)
B (IgG_1/IgG_{2a})	Tinción inespecífica positiva para PE	C1	1
	Tinción inespecífica positiva para PE y FITC	C2	0
	Sin tinción, negativo para PE y FITC	C3	98
	Tinción inespecífica positiva para FITC	C4	0

Examine la pantalla del ordenador y el informe de laboratorio para el tubo B de control. Una vez definidos los marcadores, si más del 5 % de los hemogramas totales para el tubo B se encuentran en C1, C2 o C4, se sospecha que hay tinción inespecífica. El software lo notifica al operador con un mensaje «too much nonspecific staining» (demasiada tinción inespecífica). En este caso, los resultados para el tubo C y los tubos adicionales del panel de reactivos deben considerarse no fiables. Si se muestra este mensaje de error, debe obtenerse una muestra nueva de la alícuota original de sangre completa con anticoagulante y repetirse todo el proceso de tinción. Consulta la sección Solución de problemas al final de estas instrucciones de uso.

Es necesario realizar un examen visual de los gráficos de puntos obtenidos para el tubo C (y cualquier tubo adicional) para asegurar que los marcadores de fluorescencia estén correctamente definidos y que la tinción inespecífica sea mínima.

9. LIMITACIONES

- Utilice sangre recién recogida y tíñala en las 6 horas siguientes a la venopunción. Antes de proceder a la tinción, guarde la sangre a temperatura ambiente (20–25 °C) porque las células que se han refrigerado antes de la tinción pueden dar resultados anómalos. No se recomienda utilizar células fijadas con anterioridad.
- Las células teñidas y fijadas deben analizarse en las 24 horas siguientes a la tinción.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

- Algunas variables confusas, como medicamentos, que afectan a las propiedades de las células sanguíneas pueden producir resultados inexactos.[8] Por ejemplo, se ha observado una escasa diferenciación entre las células positivas y negativas en pacientes sometidos a un trasplante que han sido tratados con medicamentos inmunosupresores. Si se observa una separación escasa entre los grupos negativo y positivo, debe rechazarse el análisis (consulte la sección Solución de problemas al final de estas instrucciones de uso).
- Una variación en la configuración del área de selección de linfocitos manual o automática cambiará las cantidades relativas de las subpoblaciones analizadas. El software BD Simulset™ utiliza el tubo de BD Leucogate™ (A) para incluir al menos el 95 % de los linfocitos totales en la muestra a fin de definir el área de adquisición de linfocitos y exige un examen visual del área para la validación.
- Las muestras con eritrocitos nucleados pueden mostrar una lisis incompleta ya que la BD FACS™ Lysing Solution puede que no lise dichos eritrocitos. Esto puede suceder también cuando se analizan muestras de sangre de pacientes que padecen determinadas alteraciones hematológicas que dificultan la lisis de los eritrocitos, como mielofibrosis y esferocitosis. Los eritrocitos nucleados se contarán como residuos y, si estos superan el 10 %, el software marcará la muestra como «too many nonlymphs in gate» (demasiadas células distintas de linfocitos en el área de selección). Se recomienda rechazar los resultados de dicha muestra. Si se selecciona la opción del software Percent Lymphocyte Conversion (Porcentaje de conversión de linfocitos), el software asume que las células que no son linfocitos, como los eritrocitos nucleados o no lisados, determinadas con BD Leucogate™, no están teñidas y las resta del C3.
- El software BD Simulset™ comprueba la tinción inespecífica solamente en el tubo de control (B). El operador debe examinar los resultados impresos en busca de pruebas de tinción inespecífica en los tubos que contienen reactivos BD Simultest™ (tubo C y tubos de inmunofenotipaje de BD Simultest™ adicionales). La tinción inespecífica del anticuerpo puede indicarse cuando hay una separación escasa entre los grupos positivo y negativo en el gráfico de puntos de fluorescencia para los tubos que contienen reactivos BD Simultest™ (tubo C y tubos adicionales). La presencia de dicha tinción inespecífica puede reflejar un cambio en el reactivo o un error en la preparación de las muestras. Estas muestras deben repetirse.
- Las características de rendimiento se han determinado con los citómetros de flujo BD FACScan™ y BD FACStrak™ utilizando el software BD Simulset™. No se han establecido características de rendimiento con otros sistemas de instrumento.

10. VALORES ESPERADOS

Para conocer los valores previstos obtenidos con BD Simultest™ Control IgG_1/IgG_{2a}, consulte las instrucciones de uso del reactivo de diagnóstico in vitro BD Simultest™ específico.

11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Para ver los datos de rendimiento del inmunofenotipaje de linfocitos obtenidos con BD Simultest™ Control IgG_1/IgG_{2a}, consulte las instrucciones de uso del reactivo de diagnóstico in vitro BD Simultest™ específico.

Reactividad cruzada

Aunque el reactivo BD Simultest™ Control está diseñado para detectar tinción inespecífica, puede observarse tinción inespecífica debido al mal estado de las células con cualquier reactivo de anticuerpo. Puede deducirse la existencia de tinción inespecífica si no se observa una demarcación clara entre las células negativas y las positivas en el gráfico de fluorescencia o si más del 5 % de los hemogramas del control aparecen fuera del C3.

Consulte la sección Solución de problemas si observa tinción inespecífica.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Linealidad-recuperación

La linealidad de respuesta en un amplio intervalo de hemogramas de leucocitos se determina para cada reactivo de inmunofenotipaje de diagnóstico in vitro de BD utilizando BD Simultest™ Control en el procedimiento de ensayo. Consulte las instrucciones de uso del reactivo de diagnóstico in vitro BD Simultest™ específico para conocer el intervalo de hemogramas de leucocitos.

GARANTÍA

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

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

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible causa	Solución
Separación insuficiente entre las poblaciones fluorescentes positivas y negativas.	Reducción de la fluorescencia debido a un voltaje de PMT o a una ganancia del amplificador incorrectos.	Ejecutar el software BD FACSComp™ con BD Calibrite™ Beads. Deben cumplirse las especificaciones de intensidad en los canales de fluorescencia.
	Reactivo de anticuerpo insuficiente.	Comprobar la calibración de la pipeta, el volumen de reactivo añadido, y el volumen y la concentración de las células añadidas. Comprobar las condiciones de almacenamiento del reactivo.
Ausencia de demarcación entre los residuos y los grupos de linfocitos en el gráfico de puntos de dispersión de la luz.	Presencia de exceso de plaquetas o de eritrocitos nucleados o no lisados.	Volver a teñir una muestra nueva. Lavar las células a baja velocidad (100 *g*) durante 15 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).
	Ganancia del amplificador mal ajustada.	Ajustar la ganancia del amplificador de forma que el borde izquierdo del grupo de linfocitos comience aproximadamente en el canal 50 (escala de 256 canales). Esto es especialmente importante al ir de la configuración/compensación a las determinaciones de sangre completa. Consultar la guía del usuario o el manual del instrumento correspondiente.
	Muestra no teñida en las 6 horas siguientes a la recogida.	Recoger una muestra nueva para teñir.
	Umbral de FSC ajustado en un nivel demasiado alto o demasiado bajo.	Ajustar el umbral de FSC de forma que haya aproximadamente 10 canales de residuos (escala de 256 canales).

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico
M.N. 12...

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Problema	Posible causa	Solución
Rendimiento de la tinción de anticuerpos inferior al óptimo.	Muestra no teñida en las 6 horas siguientes a la recogida.	Recoger una muestra nueva para teñir.
	El área de selección de análisis seleccionada por el software incluía demasiados eventos que no son linfocitos.	Volver a procesar los datos con el software BD CONSORT™ 30, BD LYSYS™ II o BD Simulset™ y definir un área de selección manual. **Nota:** Un área de selección de linfocitos reducida podría dejar fuera a los linfocitos grandes (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales y linfoblastos). Si es posible, volver a adquirir las muestras una vez optimizada la dispersión (ajuste los parámetros PMT de SSC, ganancia de amplificador de FSC y umbral de FSC para separar los grupos de linfocitos de los residuos). Consultar la guía del usuario del software correspondiente.
	Marcadores de fluorescencia mal definidos.	Volver a procesar los datos con el software BD CONSORT™ 30, BD LYSYS™ II o BD Simulset™ y definir marcadores de fluorescencia manuales.
El software no puede definir un área de selección de linfocitos aceptable.	La muestra es linfopénica.	Concentrar las células mediante un método de gradiente de densidad o volver a adquirir una cantidad de eventos mayor con el software BD CONSORT™ 30 o BD LYSYS™ II.
	Umbral de FSC ajustado en un nivel demasiado alto o demasiado bajo.	Ajustar el umbral de FSC de forma que haya aproximadamente 10 canales de residuos (escala de 256 canales).
	Ganancia del amplificador mal ajustada.	Ajustar la ganancia del amplificador de forma que el borde izquierdo del grupo de linfocitos comience aproximadamente en el canal 50 (escala de 256-canales). Esto es especialmente importante al ir de la configuración/compensación a las determinaciones de sangre completa. Consultar la guía del usuario correspondiente.
	Muestra no teñida en las 6 horas siguientes a la recogida.	Recoger una muestra nueva para teñir.
	Ajuste del marcador del software inadecuado.	Volver a adquirir los datos con el software BD CONSORT™ 30 o BD LYSYS™ II.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Problema	Posible causa	Solución
Células no teñidas de la muestra teñida traspasan el marcador definido con el tubo de control B hacia C4 o C1.	Tinción inespecífica debido a que la muestra contiene células muertas o dañadas.	Recoger una muestra nueva para teñir.
	Tinción inespecífica debido a receptores Fc.	Comprobar si hay una excesiva contaminación por monocitos, granulocitos o residuos en el área de selección de linfocitos.
Tinción débil o irregular.	Concentración celular excesiva en la etapa de tinción.	Comprobar la concentración celular y ajustarla. Repetir la tinción con una muestra nueva.
	Reactivo insuficiente.	Repetir la tinción con la cantidad de reactivo adecuada.
	Células no analizadas en las 24 horas siguientes a la tinción.	Repetir la tinción con una muestra nueva. Analizar rápidamente.
	Preparación incorrecta del medio (se ha omitido la azida sódica).	Usar azida sódica en el medio de tinción y en las etapas de lavado.
	Tampón o solución fijadora con pH inadecuado.	Preparar una PBS nueva con agua grado reactivo y una solución fijadora nueva con PBS que contenga azida sódica. Ajustarla en el pH apropiado. Filtrar a través de un filtro de 0,2 µm.
	Posible contaminación bacteriana de la PBS o la solución fijadora.	Preparar una PBS nueva con agua grado reactivo y una solución fijadora nueva con PBS que contenga azida sódica. Ajustarla en el pH apropiado. Filtrar a través de un filtro de 0,2 µm.
Pocas células o ninguna.	Concentración celular demasiado baja.	Volver a poner en suspensión una muestra nueva a una concentración más alta. Repetir la tinción y el análisis.
	Funcionamiento incorrecto del citómetro de flujo.	Seguir las instrucciones para la solución de problemas del instrumento.
Aumento de la autofluorescencia.	Posible contaminación bacteriana de la PBS o la solución fijadora.	Preparar una PBS nueva con agua grado reactivo y una solución fijadora nueva. Filtrar la PBS y la solución fijadora a través de un filtro de 0,2 µm.
	Preparación de muestra insuficiente.	Recoger una muestra nueva y teñirla.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

REFERENCIAS

1. McCarthy RC, Fetterhoff TJ. Issues for quality assurance in clinical flow cytometry. *Arch Pathol Lab Med.* 1989;113:658-666.
2. Patrick CW, Swartz SJ, Harrison KA, Keller RH. Collection and preparation of hematopoietic cells for cell marker analysis. *Lab Med.* 1984;15:659-665.
3. Anderson CL, Looney RJ. Human leukocyte IgG Fc receptors. *Immunol Today.* 1986:9:264-266.
4. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
5. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry—Second Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
6. Landay AL, Muirhead KA. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopath.* 1989;52:48-60.
7. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
8. Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html. Accessed March 12, 2019.
9. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document GP41-A6.
10. Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.

PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

Para conocer las patentes de EE. UU. que pueden aplicarse, consulte bd.com/patents.

BD, el logotipo de BD, BD CONSORT, BD FACSComp, BD FACSFlow, BD FACStrak, BD LYSYS, BD Simulset, Calibrite, FACS, FACScan, Leucogate, Simultest y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company o de sus empresas afiliadas. Las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios. © 2023 BD. Todos los derechos reservados.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

Glosario de símbolos

Remítase al etiquetado del producto para consultar los símbolos aplicables.

Símbolo	Significado
	Fabricante
EC REP	Representante autorizado en la Unión Europea
CH REP	Representante autorizado en Suiza
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
SN	Número de serie
STERILE	Estéril
STERILE A	Esterilizado utilizando técnicas de procesado asépticas
STERILE EO	Esterilizado utilizando óxido de etileno
STERILE R	Esterilizado utilizando radiación
STERILE	Esterilizado utilizando vapor de agua o calor seco
	No volver a esterilizar
NON STERILE	No estéril
	No utilizar si el envase está dañado y consúltense las *instrucciones de uso*
STERILE	Vía fluida estéril
STERILE EO	Vía fluida estéril (óxido de etileno)
STERILE R	Vía fluida estéril (irradiación)
	Frágil, manejar con cuidado
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Manténgase seco
	Límite inferior de temperatura
	Límite superior de temperatura
	Límite de temperatura
%	Limitación de humedad
	Riesgos biológicos
	No reutilizar
	Consúltense las *instrucciones de uso* o consúltense las *instrucciones de uso* electrónicas
	Precaución
LATEX	Contenido o presencia de látex de caucho natural
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
CONTROL -	Control negativo
CONTROL +	Control positivo
Σ	Contenido suficiente para <*n*> pruebas
	Sólo para la evaluación del funcionamiento en diagnóstico in vitro
	Apirógeno
#	Número de paciente
	Este lado hacia arriba
	No apilar

Símbolo	Significado
	Sistema de barrera estéril única
PHT DEHP BBP	Contenido o presencia de ftalato: combinación de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y butilbenciftalato (BBP)
	Recoger por separado Indica la recogida por separado obligatoria de los residuos de aparatos eléctricos y electrónicos.
CE	Marcado CE; significa que cumple con la especificación técnica europea
	Prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente
	Producto para autodiagnóstico
Rx Only	Esto solo se aplica a EE. UU.: «Precaución: La ley federal estadounidense impone restricciones sobre este dispositivo, cuya venta debe ser realizada por un médico o por orden de este».
CC	País de fabricación «CC» debe sustituirse por el código de país de dos o tres letras.
	Hora de recogida
	Cortar
	Despegar por aquí
	Fecha de recogida
	Manténgase fuera de la luz
H_2	Se produce gas de hidrógeno
	Perforación
	Número de secuencia del panel de inicio
	Número de secuencia del panel final
	Número de secuencia interno
/	<n.º de envase>/<total de envases>
MD	Producto sanitario
	Contiene sustancias peligrosas
	Marca de conformidad ucraniana
FC	Cumple los requisitos de la FCC conforme a 21 CFR, parte 15
c UL us	Certificación de producto UL para EE. UU. y Canadá
UDI	Identificador único de dispositivo
	Importador
	Colocar la etiqueta del paciente únicamente en el área enmarcada
MR	Compatible con la resonancia magnética (RM)
MR	Compatibilidad condicional con la resonancia magnética (RM)
MR	Incompatible con la resonancia magnética (RM)
For use with	Para uso con
This Product Contains Dry Natural Rubber	Este producto contiene goma natural seca
For Export Only	Solo para exportación
Instruments	Instrumentos

Nota: La disposición del texto en los símbolos viene determinada por el diseño de la etiqueta.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

L006715(08) 2023-03

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
155 North McCarthy Boulevard
Milpitas, California 95035 USA

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Road
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Limited
14B George Bourke Drive
Mt. Wellington Auckland 1060
New Zealand

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite bdbiosciences.com.

ClinicalApplications@bd.com

eifu.bd.com

HISTORIAL

Revisión	Fecha	Cambios realizados
23-3298(03)	2023-08	Se ha actualizado la dirección legal del fabricante. Se ha actualizado el glosario de símbolos. Se ha añadido la sección «Historial». Se ha actualizado la sección «Patentes y marcas comerciales». Se ha añadido el símbolo «Rx Only» utilizado bajo prescripción. Se ha actualizado la sección «Reactivos y materiales necesarios que no se suministran».

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

BD Simultest™ CD3/CD16+CD56

Para la determinación de linfocitos citolíticos naturales humanos en sangre periférica.

50 análisis, n.º de catálogo 340042

23-23124(02)
2023-08
Español

℞ Only IVD

1. USO PREVISTO

BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 (Leu-4/11c+19) es un reactivo de inmunofluorescencia directa de dos colores que se utiliza para el hemograma de los porcentajes de linfocitos citolíticos naturales (NK) humanos maduros en sangre completa con eritrocitos lisados (LWB).

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los linfocitos humanos pueden dividirse en tres poblaciones principales basándose en su función biológica y en la expresión de antígenos de superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK. Los linfocitos T participan en la inmunidad mediada por células específicas de antígenos y regulan la secreción de inmunoglobulina por los linfocitos B. Los linfocitos NK actúan como mediadores de citotoxicidad contra determinados tumores y células diana infectadas con virus, sin que sea necesaria la presencia de moléculas de complejo de histocompatibilidad principal (CHP) de clase I o clase II en la célula diana.[1]

Aplicaciones clínicas

NOTA No en todos los estudios de esta sección se han empleado reactivos de BD.

Los linfocitos NK, identificados como $CD3^-$ y $CD16^+$ o $CD56^+$,[2] han demostrado que actúan como mediadores de citotoxicidad contra determinados tumores y células infectadas con virus. La citotoxicidad mediada por linfocitos NK no hace necesaria la presencia de moléculas de complejo de histocompatibilidad principal (CHP) de clase I o clase II en la célula diana.[1]

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se añaden reactivos de anticuerpos monoclonales a la sangre humana completa, los anticuerpos marcados con fluorocromo se unen específicamente a los antígenos de la superficie de los leucocitos. Los anticuerpos monoclonales podrían utilizarse para identificar subpoblaciones de linfocitos.

Una muestra parcial (alícuota) del paciente teñida se introduce en el citómetro de flujo y pasa en una estrecha corriente a través del trayecto de un haz de láser. Las células teñidas emiten fluorescencia cuando las excita el haz del láser, y la luz emitida se recoge y procesa mediante el citómetro de flujo.

4. REACTIVO

Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis

El reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 (suficiente para 50 análisis) se suministra en 1 ml de solución salina tamponada con gelatina y azida sódica al 0,1 %. Contiene CD3 marcado con FITC (Leu-4), clon SK7,[3-6] para la identificación de linfocitos T y la subpoblación de linfocitos T que expresa los antígenos CD16 o

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Gerente - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

CD56, o ambos. Contiene también CD16 marcado con PE, clon B73.1,[7-9] y CD56 marcado con PE, clon MY31,[10 11] para garantizar la identificación de la población de linfocitos NK. La relación fluoresceína-proteína (F:P) para los reactivos de anticuerpos monoclonales IgG de BD es de 2–5. La relación F:P para CD3 (Leu-4) FITC se ha optimizado para su uso previsto.

El anticuerpo CD3 (Leu-4) está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 de ratón y cadenas ligeras kappa. CD3 reacciona con la cadena épsilon del complejo CD3/receptor del antígeno de células T (TCR).[12] Este complejo está formado por al menos seis proteínas, con pesos moleculares de 20–30 kilodaltons (kDa).[13] El antígeno reconocido por anticuerpos CD3 se asocia de forma no covalente a TCR α/β o γ/δ (70–90 kDa).[14]

El anticuerpo CD16 (Leu-11c) está compuesto por cadenas pesadas de IgG de $ratón_1$ y cadenas ligeras kappa.[8,10] El antígeno reconocido por los anticuerpos CD16 es una proteína de 50–65 kDa que es el receptor para el Fc III de la IgG presente en los linfocitos citolíticos naturales y neutrófilos.[2]

El anticuerpo CD56[15] (Leu-19) está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 de ratón y cadenas ligeras kappa. El antígeno CD56 está presente en los linfocitos citolíticos naturales.[2,16] El anticuerpo reconoce la isoforma de 140 kDa de la molécula de adhesión celular neural (NCAM).[9,17] La proteína central de 140 kDa está extensamente glucosilada para dar un antígeno maduro.[11,18] El antígeno CD56 está presente básicamente en todos los linfocitos citolíticos naturales $CD16^+$ en reposo y activados, así como aproximadamente en el 5 % de los linfocitos de sangre periférica $CD3^+$.[2] La densidad del antígeno CD56 aumenta cuando los linfocitos citolíticos naturales están activados.[19] Los linfocitos T $CD3^+CD56^+$ forman una subpoblación única de linfocitos T citotóxicos que media en la citotoxicidad no restringida por el CPH.[2] El antígeno CD56 interviene en la adhesión de células homotípicas neuronales y en la diferenciación celular durante la embriogénesis.[11]

Precauciones

- Para uso diagnóstico in vitro.
- Cuando se almacena a una temperatura de 2–8 °C, el reactivo de anticuerpo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No se debe utilizar después de la fecha de caducidad.
- El reactivo de anticuerpo no se debe congelar ni exponer a la luz directa durante el almacenamiento o la incubación con células. Mantenga seco el vial del reactivo.
- Cualquier alteración en el aspecto del reactivo, como la precipitación o decoloración, es un indicio de inestabilidad o deterioro. En ese caso, no utilice el reactivo.
- El reactivo del anticuerpo contiene azida sódica como conservante. Sin embargo, es preciso extremar las precauciones para evitar la contaminación microbiana, que podría causar resultados erróneos.

ADVERTENCIA Se consideran de riesgo biológico todas las muestras biológicas y todos los materiales que hayan entrado en contacto con ellas. Manipular como si pudieran transmitir alguna infección [20,21] y desechar tomando las precauciones adecuadas según la normativa federal, estatal y local. Nunca pipetee con la boca. Utilice ropa protectora, protección ocular y guantes adecuados.

- Visite regdocs.bd.com/regdocs/sdsSearch para descargar la ficha de datos de seguridad.

Las concentraciones se muestran en la tabla siguiente:

Reactivo	Concentración (µg/ml)
CD3 FITC	25,0
CD16 PE	6,25
CD56 PE	12,5

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

5. INSTRUMENTO

El reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 está diseñado para utilizarse en un citómetro de flujo de BD que esté equipado con el hardware, el software y la electrónica de conmutación adecuados. El citómetro de flujo debe estar equipado para detectar fluorescencia bicolor, dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC). Se recomienda utilizar el software BD Simulset™, versión 2.5 o posterior, para la adquisición y el análisis de datos.

Todas las características de rendimiento se obtuvieron con un citómetro de flujo BD FACScan™ y se verificaron en un citómetro de flujo BD FACStrak™. Es posible que los demás sistemas tengan características distintas, por lo que el usuario deberá verificarlos.

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Extraiga la sangre de forma aséptica por venopunción[22,23] en un BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tube estéril o equivalente. Para este procedimiento se necesita como mínimo 1 ml de sangre completa. Para obtener resultados óptimos, la sangre debe teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. La sangre con anticoagulante puede almacenarse a temperatura ambiente (20–25 °C) durante un máximo de 6 horas, hasta que esté lista para la tinción. Las muestras de sangre que se refrigeren antes de la tinción pueden arrojar resultados anómalos.

Deben hacerse un hemograma de leucocitos y una fórmula leucocitaria a partir de la misma muestra de sangre completa antes de la tinción. Se considera aceptable un intervalo de concentración de leucocitos de $3,5 \times 10^3$–$9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl. Las muestras con hemogramas superiores a $9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl deben diluirse con una solución salina amortiguada con fosfato (PBS) 1X que contenga azida sódica al 0,1 %. Para muestras con recuentos inferiores a $3,5 \times 10^3$ leucocitos/µl podría ser necesaria más sangre, así como un procedimiento de separación para concentrar las células.

Condiciones que causan interferencias

No deben utilizarse muestras de pacientes previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre completa que se refrigeren antes de la tinción pueden arrojar resultados anómalos. Para obtener resultados óptimos, las muestras de sangre deben teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. Las muestras obtenidas de pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores pueden ofrecer una escasa diferenciación.[24] La presencia de blastocitos o de eritrocitos no lisados o nucleados puede interferir en los resultados del análisis. Las muestras hemolizadas deben rechazarse. Siga las indicaciones del fabricante del tubo de recogida para conocer cuál es el volumen mínimo de sangre que se debe recoger.

PRECAUCIÓN Tome las precauciones habituales al recoger, manipular y desechar todas las muestras de sangre humana y reactivos potencialmente cancerígenos.

7. PROCEDIMIENTO

Reactivo suministrado

Consulte Reactivo suministrado, suficiente para 50 análisis y Precauciones en la sección 4, Reactivo.

Reactivos y materiales necesarios pero no suministrados

- Reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (CD45/CD14), 1 ml (n.º de catálogo 340040). Para determinar el área de selección de los análisis de linfocitos, consulte las instrucciones de uso de BD Simultest™ Leucogate™, el documento BD *Monoclonal Antibodies Source Book* (Manual de anticuerpos monoclonales de BD), sección 5.2, y el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

del software BD Simulset™). Conserve a 2–8 °C.

- Reactivo BD Simultest™ Control γ_1/γ_{2a} (IgG_1 FITC/IgG_{2a} PE) (ambos específicos de hemocianina de lapa californiana), 1 ml (n.º de catálogo: 340041). Conserve a 2–8 °C.
- BD FACS™ Lysing Solution (10X), 100 ml (n.º de catálogo 349202). Conserve a 2–25 °C. Para usarlo, diluya a 1:10 con agua apta para reactivos a temperatura ambiente (20–25 °C). Conserve en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente. La solución preparada se mantendrá estable durante un mes a temperatura ambiente. Consulte las instrucciones de uso de BD FACS™ Lysing Solution.
- BD Calibrite™ Beads (n.º de catálogo 349502). Para obtener información de uso detallada, consulte las instrucciones de uso de BD Calibrite™ Beads.
- BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tubes o equivalentes.
- Tubos de ensayo Falcon® desechables de poliestireno de 12 × 75 mm o equivalente.
- Agitador vorticial.
- Centrífuga de baja velocidad (velocidad mínima 200 *g*) con rotor de cesto giratorio y soportes para tubos de 12 × 75 mm.
- Aspirador de vacío con depósito.
- Micropipeta con puntas.
- Un tampón de lavado de PBS con azida sódica al 0,1 %.
- Solución fijadora (solución de paraformaldehído [PFA] al 1 % en PBS 1X con azida sódica al 0,1 %).

  Almacene a una temperatura de 2–8 °C en un recipiente de vidrio ámbar durante un máximo de 1 semana.
- BD FACSFlow™ Sheath Fluid (n.º de catálogo 342003) o equivalente.

  PRECAUCIÓN Utilice únicamente diluyente BD FACSFlow™ Sheath Fluid para diluir BD Calibrite™ Beads.
- Agua apta para reactivos (destilada y desionizada).

Tinción y fijación de las células

Las muestras de sangre completa se tiñen primero con los reactivos BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 (tubo C). Después de la tinción, se utiliza BD FACS™ Lysing Solution diluida (1X) para lisar los eritrocitos. Evite exponer los tubos a la luz directa. Realice el procedimiento a temperatura ambiente (20–25 °C) utilizando reactivos a temperatura ambiente. Consulte el punto Precauciones en la sección 4, Reactivo.

1. Para cada muestra de paciente, etiquete tres tubos A, B y C de 12 × 75 mm. Además, etiquete cada tubo con el número de identificación de la muestra.
2. Coloque 20 µl de reactivo BD Simultest™ Leucogate™ en el tubo A, 20 µl de reactivo BD Simultest™ Control en el tubo B y 20 µl de reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 en el tubo C.
3. Para cada tubo de muestra, utilice una punta de micropipeta nueva y añada con cuidado 100 µl de sangre completa con anticoagulante bien mezclada en el fondo de cada uno de los tres tubos etiquetados. La concentración de leucocitos recomendada es de $3,5 \times 10^3$–$9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 15–30 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

ESTEBAN ZORZOLI
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

NOTA Proteja las muestras de la luz directa durante este procedimiento de incubación y tenga cuidado para evitar que se vierta sangre por el lateral del tubo. Si queda sangre completa en el lateral del tubo, no se teñirá con el reactivo.

4. Diluya la BD FACS™ Lysing Solution (10X) a 1X siguiendo las instrucciones que figuran en el punto Reactivos y materiales necesarios pero no suministrados de la sección 7, Procedimiento. Añada 2 ml de BD FACS™ Lysing Solution 1X a temperatura ambiente (20–25 °C) en cada tubo. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 10–12 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (20–25 °C). No incube durante más de 12 minutos.

NOTA Evite la exposición prolongada de las células a los reactivos líticos, ya que podría provocar la destrucción de leucocitos.

5. Inmediatamente después de la incubación, centrifugue los tubos a 300 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).
6. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.
7. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para volver a suspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 2 ml de PBS con azida sódica al 0,1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Centrifugue a 200 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).
8. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.
9. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para volver a suspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 0,5 ml de paraformaldehído al 1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Compruebe que las células estén bien mezcladas con la solución fijadora.
10. Las células ya están listas para analizarse en el citómetro de flujo. Tape o cubra los tubos preparados y almacénelos a una temperatura de 2–8 °C en un lugar oscuro hasta el momento del análisis por citometría de flujo. Analice las células fijadas en las 24 horas posteriores a la tinción. Agite a conciencia las células en el agitador vorticial a baja velocidad para reducir la agregación celular antes de realizar el análisis a través del citómetro de flujo.[25]

Citometría de flujo

Siga las instrucciones de BD para el análisis por citometría de flujo bicolor y consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™).

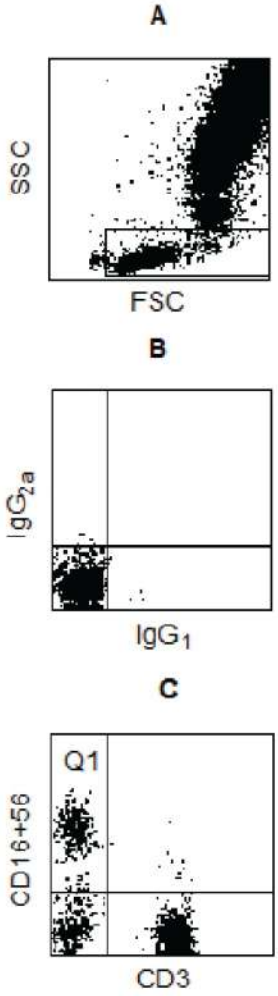
Control de calidad

Para obtener resultados óptimos, se recomienda utilizar BD Calibrite™ Beads y el software AutoComp™ para configurar los voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT), ajustar la compensación de fluorescencia y verificar la sensibilidad del instrumento antes de usar el reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 en un citómetro de flujo BD FACScan™.

Se recomienda analizar diariamente una muestra de control de un sujeto adulto normal para optimizar los parámetros del instrumento y como comprobación de control de calidad del sistema. En la figura 1 se muestran los resultados correctos para una muestra de un paciente normal desde el punto de vista hematológico.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 14...
Apoderado
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Figura 1 Muestra de LWB de BD FACScan™, de un paciente hematológicamente normal, teñida con reactivos BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A), BD Simultest™ Control (tubo B) y BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 (tubo C).



NOTA El reactivo BD Simultest™ Leucogate™ se utilizó para reducir los residuos, los monocitos y los granulocitos en el área de selección que se muestra para el tubo A. Se muestran gráficos de puntos de FL1 (eje X) frente a FL2 (eje Y) para los tubos B y C.

El reactivo BD Simultest™ Control se procesa con cada muestra de paciente para definir los marcadores de fluorescencia 1 (FL1) y fluorescencia 2 (FL2) entre grupos de linfocitos teñidos negativa y positivamente, así como para detectar la presencia de tinción inespecífica, que indicaría resultados erróneos del paciente.

Examine visualmente el gráfico de puntos correspondiente al tubo B de reactivo BD Simultest™ Control. Si el grupo negativo es difuso y está esparcido por el intervalo de intensidad de FL2, puede que el marcador no se haya ajustado correctamente y que los resultados no sean fiables.

El software BD Simulset™ examinará automáticamente los datos y alertará al operador mediante una serie de posibles mensajes de error. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para obtener una lista con los posibles mensajes. Utilice los criterios siguientes

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15843
Co-Director Técnico - Apoderado
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

para el examen de los gráficos de puntos obtenidos para cada muestra con el fin de evaluar la calidad de los datos obtenidos.

- El operador debe rechazar los resultados si recibe uno o más de los mensajes de error siguientes para el control normal: no separation between cellular populations (no hay separación entre poblaciones celulares); too few lymphocytes (less than 500) (linfocitos demasiado escasos [menos de 500]); excessive RBC or nucleated RBC contamination and debris (greater than 10%) (contaminación con eritrocitos excesivos o eritrocitos nucleados y residuos [superior al 10 %]); o excessive monocyte (greater than 3%) or granulocyte (greater than 6%) contamination of the lymphocyte gate (contaminación excesiva con monocitos [superior al 3 %] o granulocitos [superior al 6 %] del área de selección de linfocitos).
- Si no hay un motivo obvio para que falle el control normal, debe teñirse y procesarse una muestra de otro control normal y repetirse todo el procedimiento de tinción en todas las muestras siguientes.
- Las muestras con eritrocitos nucleados pueden contener un exceso de residuos debido a una lisis incompleta de estos con BD FACS™ Lysing Solution. El exceso de residuos también podrá presentarse cuando se analicen muestras de sangre de pacientes con determinados trastornos hematológicos que dificulten la lisis de los eritrocitos, como mielofibrosis y esferocitosis. Los eritrocitos nucleados se contarán como residuos y, si estos superan el 10 %, el software marcará la muestra como «too many nonlymphs in gate» (demasiadas células distintas de linfocitos en el área de selección) y sus resultados deberán rechazarse.
- La diferencia entre tubos en los eventos incluidos en el área de selección debe ser inferior o igual a 500 eventos para todos los tubos del panel, excepto para el reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A). (Sin embargo, si el tubo del reactivo BD Simultest™ Control presenta problemas, el panel no será fiable).

8. RESULTADOS

Porcentaje de conversión de linfocitos

Cuando se realiza el cálculo del porcentaje de conversión de linfocitos, la subpoblación de linfocitos $CD3^-$ y $CD16^+$ y/o $CD56^+$ se informa como un porcentaje de los linfocitos incluidos en el área de selección para análisis de linfocitos. Si no se realiza el cálculo, los resultados se indican como un porcentaje de los eventos del área de selección. Consulte la tabla 1.

Tabla 1 Intervalos de referencia representativos para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 en adultos hematológicamente normales como porcentajes de los linfocitos del área de selección totales (convertidos) (datos agrupados de tres centros clínicos)

Parámetro	Sexo	Edad	n	Media (%)	Intervalo del 95 %
Linfocitos citolíticos naturales	Ambos	18–70	160	14	5,6–31,0

Fórmula leucocitaria en tres partes

Para la sangre completa lisada, es posible calcular los monocitos, los linfocitos y los granulocitos como un porcentaje de los leucocitos utilizando el reactivo BD Simultest™ Leucogate™ (tubo A). El software BD Simulset™ calcula automáticamente una fórmula leucocitaria en tres partes. Consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™) para obtener impresiones de datos representativos.

NOTA La fórmula leucocitaria proporcionada por el software BD Simulset™ debe utilizarse solamente para realizar una comparación con una fórmula leucocitaria independiente con fines de control de calidad y no

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15849
Perito

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

debe sustituir a una fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente en las historias clínicas de los pacientes ni introducirse en el software BD Simulset™ para obtener recuentos absolutos.

Recuentos absolutos

Puede calcularse un hemograma completo si se obtiene un hemograma de leucocitos y el porcentaje de linfocitos de una fórmula leucocitaria independiente mediante procedimientos de laboratorio estándar. Para obtener instrucciones de cálculo de hemogramas completos, consulte el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™).

9. LIMITACIONES

- Es necesario que los laboratorios definan sus propios intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 que puedan verse afectados por el sexo o la edad del paciente, así como la técnica utilizada en la preparación. La raza del paciente también puede influir, aunque aún no se dispone de suficientes datos para respaldar esta afirmación. Es necesario conocer la edad, el sexo, el estado clínico y la raza de los sujetos a la hora de determinar un intervalo de referencia.
- Los resultados del reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 deben utilizarse junto con otra información obtenida de la evaluación clínica y procedimientos de diagnóstico independientes adicionales.
- El reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 no está diseñado para la discriminación de muestras por la presencia de células leucémicas, ni para utilizarse en muestras fenotípicas de pacientes con leucemia. La presencia de blastocitos podría impedir que el BD Simultest™ Leucogate™ defina un área de selección de análisis de linfocitos adecuada. El software marcará la muestra y no se imprimirán los resultados.
- Los valores del recuento absoluto de las subpoblaciones de linfocitos podrían no ser comparables entre laboratorios debido a las variaciones en los métodos de determinación de los recuentos de leucocitos, valores de las fórmulas leucocitarias o ambos.

10. VALORES ESPERADOS

Subpoblaciones de leucocitos

La población de linfocitos citolíticos naturales presente en el cuadrante 1 (Q1) del tubo C se muestra en la figura 1 y en el documento *BD Simulset™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simulset™). Los resultados clínicamente significativos se encuentran en el informe del médico.

BD ha investigado los intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 en 160 sujetos mediante el citómetro de flujo BD FACScan™ en tres centros (dos centros clínicos de EE. UU. y los laboratorios de BD en San José, California). Los intervalos de referencia normales previstos de linfocitos citolíticos naturales para leucocitos se muestran en la tabla 1.[26]

No se deben utilizar los intervalos de referencia para adultos con muestras de sangre de pacientes pediátricos.

La raza también puede ser una variable en la definición de los intervalos de referencia normales,[27] aunque BD no ha recopilado datos suficientes para determinarlo. Los valores normales previstos pueden variar según la edad, el sexo o la raza del paciente. Debido a estas diferencias, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia normal para cada parámetro.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El rendimiento del reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 se estableció mediante análisis en dos centros clínicos de EE. UU. y en los laboratorios de BD en San José, California.

Reproducibilidad intramuestral

En la tabla 2 se muestra la reproducibilidad intramuestral media obtenida tanto para sujetos normales como para sujetos anómalos.

Reproducibilidad interinstrumental

En la tabla 3 se muestran los resultados de reproducibilidad interinstrumental.

Reproducibilidad entre laboratorios

La reproducibilidad entre laboratorios se indica mediante la capacidad para agrupar los intervalos de referencia normales para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 (tabla 1).

BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 frente al método comparativo

En la tabla 4 se presenta un resumen de los resultados.

Tabla 2 Reproducibilidad intramuestral para el reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 (seis sujetos normales y cuatro sujetos anómalos) como porcentajes de linfocitos (convertidos)

Sujetos	Parámetro	Media (%)	DE[a] entre tinciones	df[b]	DE[a] entre tinciones	df[b]
Normales	Linfocitos citolíticos naturales	13,3	1,4	12	1,4	17,8
Anómalos	Linfocitos citolíticos naturales	8,0	0,7	8	0,7	11,5

a. DE = desviación estándar

b. df = grados de libertad

Tabla 3 Reproducibilidad interinstrumental para los parámetros del reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 (cinco sujetos normales y dos instrumentos) como porcentajes de linfocitos (convertidos)

Parámetro	Instrumento	Media	DE	CV
Linfocitos citolíticos naturales	1	12,9	0,46	3,58
	2	13,4	0,41	3,06

Tabla 4 Reactivo BD Simultest™ CD3/CD16+CD56 frente al método comparativo[a] (panel de reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte y panel de reactivos BD Simultest™ IMK Plus)

Parámetro	Pendiente	Intersección	r	n	Intervalo de datos (%)	
					IMK Plus	IMK-Lymphocyte
Linfocitos citolíticos naturales	0,96	0,37	0,96	85	2–32	1–33

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

a. Los datos se recopilaron en un citómetro de flujo BD FACScan™ utilizando reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, que incluían reactivos BD Leucogate™, Control γ1/γ2a y CD3/CD16+CD56. El software empleado fue el BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, de la familia de software BD Simulset™.

Estabilidad de las preparaciones celulares teñidas

Se recomienda analizar las muestras en las 24 horas siguientes a la tinción.

Reactividad cruzada

El antígeno CD16 se expresa en los neutrófilos[2]. El antígeno CD56 está presente aproximadamente en el 5 % de los linfocitos de sangre periférica $CD3^{+2}$.

Linealidad-recuperación

Se espera que los resultados sean lineales de $3,5 \times 10^3$–$9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl.

GARANTÍA

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

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

REFERENCIAS

1. Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T, et al. A definition of natural killer cells. In: Ades EW, Lopez C, eds. *Natural Killer Cells and Host Defense.* Basel: Karger; 1989:1.
2. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1986;136:4480-4486.
3. Haynes B. Summary of T cell studies performed during the second international workshop and conference on human leukocyte differentiation antigens. In: Reinherz E, Haynes B, Nadler L, Bernstein I, eds. *Leukocyte Typing II: Vol. 1 Human T Lymphocytes.* New York: Springer-Verlag.
4. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and T-cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med.* 1981;153:310-323.
5. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti–Leu-4 antibody. *J Immunol.* 1983;131:536-539.
6. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes.* Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:259-288.
7. Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J Immunol.* 1983;130:2133-2141.
8. Perussia B, Acuto O, Terhorst C, et al. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J Immunol.* 1983;130:2142-2148.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

9. Schmidt RE. Non-lineage/natural killer section report: new and previously defined clusters. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:517-574.
10. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A, et al. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1984;133:180-189.
11. Schubert J, Lanier LL, Schmidt RE. Cluster report: CD56. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.
12. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood*. 1988;71:603-612.
13. Brenner MB, Groh V, Porcelli SA, et al. Structure and distribution of the human γ/δ T-cell receptor. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:1049-1053.
14. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:629-662.
15. Edelman G. Cell adhesion molecules. *Science*. 1983;219:450-457.
16. Knapp W, Rieber P, Dörken B, Schmidt R, Stein H, van dem Borne A. Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. *Immunol Today*. 1989;10:253-258.
17. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of the Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*. 1989;169:2233-2238.
18. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol*. 1991;146:4421-4426.
19. Phillips J, Lanier L. Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytolysis. *J Exp Med*. 1986;164:814-825.
20. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
21. Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html. Accessed March 12, 2019.
22. *Collection of Diagnostic Venous Blood Specimens; Approved Standard—Seventh Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. CLSI document GP41Ed7E.
23. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
24. Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
25. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
26. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
27. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol*. 1985;3:33-37.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

Para conocer las patentes de EE. UU. que pueden aplicarse, consulte bd.com/patents.

BD, el logotipo de BD, BD FACSFlow, BD FACStrak, BD Simulset, Calibrite, FACS, FACScan, Leucogate, Simultest y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company o de sus empresas afiliadas. Las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios. © 2023 BD. Todos los derechos reservados.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

Glosario de símbolos

Remítase al etiquetado del producto para consultar los símbolos aplicables.

Símbolo	Significado
	Fabricante
EC REP	Representante autorizado en la Unión Europea
CH REP	Representante autorizado en Suiza
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
SN	Número de serie
STERILE	Estéril
STERILE A	Esterilizado utilizando técnicas de procesado asépticas
STERILE EO	Esterilizado utilizando óxido de etileno
STERILE R	Esterilizado utilizando radiación
STERILE	Esterilizado utilizando vapor de agua o calor seco
	No volver a esterilizar
NON STERILE	No estéril
	No utilizar si el envase está dañado y consúltense las *instrucciones de uso*
STERILE	Vía fluida estéril
STERILE EO	Vía fluida estéril (óxido de etileno)
STERILE R	Vía fluida estéril (irradiación)
	Frágil, manejar con cuidado
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Manténgase seco
	Límite inferior de temperatura
	Límite superior de temperatura
	Límite de temperatura
	Limitación de humedad
	Riesgos biológicos
	No reutilizar
	Consúltense las *instrucciones de uso* o consúltense las *instrucciones de uso* electrónicas
	Precaución
LATEX	Contenido o presencia de látex de caucho natural
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
CONTROL -	Control negativo
CONTROL +	Control positivo
Σ	Contenido suficiente para <*n*> pruebas
	Sólo para la evaluación del funcionamiento en diagnóstico in vitro
	Apirógeno
#	Número de paciente
	Este lado hacia arriba
	No apilar

Símbolo	Significado
	Sistema de barrera estéril única
PHT DEHP BBP	Contenido o presencia de ftalato: combinación de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y butilbenciftalato (BBP)
	Recoger por separado Indica la recogida por separado obligatoria de los residuos de aparatos eléctricos y electrónicos.
CE	Marcado CE; significa que cumple con la especificación técnica europea
	Prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente
	Producto para autodiagnóstico
Rx Only	Esto solo se aplica a EE. UU.: «Precaución: La ley federal estadounidense impone restricciones sobre este dispositivo, cuya venta debe ser realizada por un médico o por orden de este».
CC	País de fabricación «CC» debe sustituirse por el código de país de dos o tres letras.
	Hora de recogida
	Cortar
	Despegar por aquí
	Fecha de recogida
	Manténgase fuera de la luz
H_2	Se produce gas de hidrógeno
	Perforación
	Número de secuencia del panel de inicio
	Número de secuencia del panel final
	Número de secuencia interno
/	<n.º de envase>/<total de envases>
MD	Producto sanitario
	Contiene sustancias peligrosas
	Marca de conformidad ucraniana
	Cumple los requisitos de la FCC conforme a 21 CFR, parte 15
c UL us	Certificación de producto UL para EE. UU. y Canadá
UDI	Identificador único de dispositivo
	Importador
	Colocar la etiqueta del paciente únicamente en el área enmarcada
MR	Compatible con la resonancia magnética (RM)
MR	Compatibilidad condicional con la resonancia magnética (RM)
MR	Incompatible con la resonancia magnética (RM)
For use with	Para uso con
This Product Contains Dry Natural Rubber	Este producto contiene goma natural seca
For Export Only	Solo para exportación
Instruments	Instrumentos

Nota: La disposición del texto en los símbolos viene determinada por el diseño de la etiqueta.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

L006715(08) 2023-03

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
155 North McCarthy Boulevard
Milpitas, California 95035 USA

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Road
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Limited
14B George Bourke Drive
Mt. Wellington Auckland 1060
New Zealand

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite bdbiosciences.com.

ClinicalApplications@bd.com

eifu.bd.com

HISTORIAL

Revisión	Fecha	Cambios realizados
23-23124(02)	2023-08	Se ha actualizado la dirección legal del fabricante. Se ha actualizado el glosario de símbolos. Se ha añadido la sección «Historial». Se ha añadido la sección «Patentes y marcas comerciales». Se ha actualizado la sección «Reactivos y materiales necesarios pero no suministrados». Se ha añadido la sección «Garantía».

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

BD Simultest™ IMK-Lymphocyte

N.º de catálogo 340182

23-23279(02)
2023-08
Español

℞ Only IVD

1. USO PREVISTO

El BD Simultest™ IMK-Lymphocyte es un kit de reactivos de inmunofluorescencia directa de dos colores que se utiliza para el hemograma de porcentajes de las siguientes subpoblaciones de leucocitos humanos maduros en sangre completa lisada con eritrocitos (LWB): linfocitos T ($CD3^+$), linfocitos B ($CD19^+$), linfocitos T colaboradores/inductores ($CD3^+CD4^+$), linfocitos T supresores/citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) y linfocitos citolíticos naturales (NK) ($CD3^-CD16^+$ o $CD56^+$, o ambos). También permite determinar la proporción de linfocitos T colaboradores/supresores ($CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$).

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los linfocitos humanos pueden dividirse en tres poblaciones principales basándose en su función biológica y en la expresión de antígenos de superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK. Los linfocitos T participan en la inmunidad mediada por células específicas de antígenos y regulan la secreción de inmunoglobulina por los linfocitos B. Los linfocitos T se pueden clasificar también según sus propiedades funcionales como colaboradores/inductores y supresores/citotóxicos. Los linfocitos citolíticos naturales actúan como mediadores de citotoxicidad contra determinados tumores y células diana infectadas con virus, sin que sea necesaria la presencia de moléculas de complejo de histocompatibilidad principal (CHP) de clase I o clase II en la célula diana.[1]

Los métodos históricos de ensayo de subpoblaciones de linfocitos eran problemáticos porque dependían de la técnica, requerían mucho tiempo o no eran muy específicos de la estirpe celular. Entre los métodos clásicos se incluían la identificación de linfocitos T mediante la formación de rosetas con eritrocitos de sangre de oveja (SRBC)[2–4] y la identificación de linfocitos B con anticuerpos policlonales marcados con fluorocromo específicos de inmunoglobulina superficial.[5–7]

Se han utilizado reactivos de anticuerpos para distinguir los antígenos de superficie celular mediante microscopia de fluorescencia, microscopia electrónica y ensayo con marca radiactiva.[8] Los métodos de microscopia no son muy sensibles debido al número limitado de células que se pueden analizar, mientras que los métodos que emplean isótopos radiactivos exigen consideraciones de seguridad y eliminación de residuos adicionales. Los ensayos con linfocitos citolíticos incluían el ensayo en placa hemolítica[9] y un ensayo de citotoxicidad para detectar la liberación de cromo radiactivo.[10] El desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos de antígenos leucocitarios humanos proporcionó reactivos de especificidad única, una importante mejora respecto a los antisueros heterólogos.[11] La citometría de flujo mejoró la sensibilidad de la detección de antígenos y la reproducibilidad de la identificación de subpoblaciones de leucocitos en comparación con el microscopio.[12] La citometría de flujo con inmunofluorescencia indirecta, al tiempo que proporciona sensibilidad de ensayo,[13] exige un paso adicional para añadir el reactivo secundario marcado con fluorocromo.

ORTEGAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Los linfocitos de sangre completa humana tradicionalmente se preparaban para el análisis mediante citometría de flujo utilizando métodos de separación en gradientes de densidad. Diversos estudios han demostrado que estos métodos requerían mucho tiempo, implicaban varios pasos de manipulación de la sangre, y podían provocar la pérdida de subpoblaciones de linfocitos.[12,14–16] El método LWB utilizado con BD Simultest™ IMK-Lymphocyte no requiere separación en gradientes de densidad y, por tanto, permite un tiempo de preparación de las muestras más corto y menor manipulación de la sangre completa[12] (consulte el documento BD *Monoclonal Antibodies Source Book* [Manual de referencia de anticuerpos monoclonales de BD], sección 2.2). Los estudios han demostrado también que el método LWB tiene menor probabilidad de ocasionar una pérdida de subpoblaciones de linfocitos y puede ayudar a mejorar la reproducibilidad del ensayo en comparación con métodos anteriores.[12,15,16]

El desarrollo de anticuerpos monoclonales y de la tecnología de citometría de flujo ha posibilitado nuevas formas de identificar subpoblaciones de leucocitos y de monitorización inmunológica. Los anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo y la citometría de flujo multicolor permiten la cuantificación simultánea de dos o más subpoblaciones de leucocitos. La monitorización inmunológica se facilita mediante citómetros de flujo, como los sistemas BD FACScan™ y BD FACStrak™, que caracterizan las células por medio de análisis de cuatro parámetros. Los sistemas BD FACScan™ y BD FACStrak™, cuando se utilizan con el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, caracterizan hasta 50 000 células en una sola muestra mediante el análisis simultáneo de la dispersión frontal (FSC), la dispersión lateral (SSC) y la fluorescencia multicolor.

Aplicaciones clínicas

NOTA No en todos los estudios de esta sección se han empleado reactivos de BD.

Los porcentajes de linfocitos T y B totales se pueden utilizar para caracterizar algunas formas de enfermedades de inmunodeficiencia[17–19] y autoinmunitarias.[20,21]

La determinación de los porcentajes de linfocitos CD4+ y CD8+ puede ser útil para controlar el estado inmunológico de pacientes con enfermedades de inmunodeficiencia, enfermedades autoinmunitarias o reacciones inmunitarias. Se ha informado de que el porcentaje relativo de la subpoblación de CD4+ es reducido y que el porcentaje relativo de la subpoblación de CD8+ es elevado en un gran número de pacientes con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, como la inmunodeficiencia combinada grave (IDCG)[17] y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).[22]

Un porcentaje de linfocitos T supresores/citotóxicos puede quedar fuera del intervalo de referencia normal en algunas enfermedades autoinmunitarias[23] y en determinadas reacciones inmunitarias, como la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) aguda,[24] y los rechazos de trasplantes.[25] El porcentaje relativo de la población de linfocitos CD8+ con frecuencia puede disminuir en el lupus eritematoso sistémico (LES) activo, pero también puede aumentar en pacientes con LES sometidos a terapia con esteroides.[21]

Los linfocitos T colaboradores/inductores son una subpoblación de linfocitos T (CD3+) que también expresan el antígeno CD4. Los linfocitos T supresores/citotóxicos expresan el antígeno CD8 y son principalmente una subpoblación de linfocitos T (CD3+), aunque una subpoblación de linfocitos citolíticos naturales también es positiva para CD8−.[26]

La proporción de linfocitos CD4+/CD8+ se puede cuantificar como la proporción entre linfocitos positivos para FITC CD4 y linfocitos positivos para PE CD8. El método más habitual que se ha venido utilizando para determinar la proporción de CD4/CD8 es un solo reactivo bicolor que contiene anticuerpos CD4 y CD8. La proporción de CD4+/CD8+ se ha utilizado para evaluar el estado inmunológico de pacientes con un diagnóstico o sospecha de desarrollo de enfermedades autoinmunitarias[21,22] o que se sabe que tienen inmunodeficiencias.[4,22] Además, la proporción se ha utilizado para controlar la aparición de EICH aguda en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea.[24]

ORTEGAN ZORZOLI
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

La proporción de linfocitos colaboradores/supresores convencional (CD4/CD8) no distingue entre la expresión del antígeno CD8 de los linfocitos T y citolíticos naturales, o entre los linfocitos T colaboradores/inductores y los monocitos que expresan el antígeno CD4 en números de copias bajos.[22,27] Las combinaciones de reactivos proporcionadas en el kit permiten la enumeración e identificación por separado de linfocitos T colaboradores/inductores $CD3^+CD4^+$ y de linfocitos T supresores/citotóxicos $CD3^+CD8^+$ para evitar la contaminación de los monocitos $CD3^-CD4^+$ y los linfocitos citolíticos naturales $CD3^-CD8^+$.[22] En lugar de utilizar un solo reactivo que contenga CD4 y CD8, el kit BD Simultest™ IMK-Lymphocyte utiliza dos reactivos de anticuerpos monoclonales (CD3/CD4 y CD3/CD8) para determinar la proporción de linfocitos T colaboradores/supresores verdaderos ($CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$). La proporción de linfocitos T colaboradores/supresores verdaderos no incluye los monocitos positivos para CD4 ni los linfocitos citolíticos naturales positivos para CD8.

Los linfocitos citolíticos naturales, identificados como $CD3^-$, $CD16^+$ y/o $CD56^+$, han demostrado actuar como mediadores de citotoxicidad contra determinados tumores y células diana infectadas con virus.

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se añaden reactivos de anticuerpos monoclonales a la sangre humana completa, los anticuerpos marcados con fluorocromo se unen específicamente a los antígenos de la superficie de los leucocitos. Las muestras teñidas se tratan con BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Lysing Solution (reactivo G) para lisar los eritrocitos. A continuación, las muestras se lavan y fijan antes del análisis mediante citometría de flujo.

Una muestra parcial (alícuota) del paciente teñida se introduce en el citómetro de flujo y pasa en una estrecha corriente a través del trayecto de un haz de láser. Las células teñidas emiten fluorescencia cuando las excita el haz del láser, y la luz emitida se recoge y procesa mediante el citómetro de flujo. El uso de dos fluorocromos permite un análisis bicolor simultáneo, puesto que cada fluorocromo emite luz a una longitud de onda diferente cuando es excitado a 488 nm por un láser de iones de argón. Los linfocitos teñidos con FITC emiten luz de color amarillo verdoso (emisión máxima aproximada de 515 nm), mientras que los linfocitos teñidos con PE emiten luz de color rojo anaranjado (emisión máxima aproximada de 580 nm).

Las células interactúan también con el haz del láser dispersando la luz. La luz FSC proporciona una medida que coincide bastante con el tamaño de las células, mientras que la luz SSC es una indicación de la granularidad celular. Los citómetros de flujo BD FACScan™ y BD FACStrak™ utilizados con el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte cuentan un número de células suficiente para garantizar que en el área de selección de análisis se incluyan un mínimo de 2000 linfocitos. Los archivos de datos deben guardarse en modo de lista y se les deben asignar nombres lógicos que ayuden a recuperarlos para realizar análisis posteriores mediante el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte.

El software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte utiliza la muestra BD Leucogate™, reactivo A, para establecer automáticamente un área de selección de análisis de linfocitos que incluya un porcentaje igual o superior al 98 % de linfocitos maduros normales de la muestra. No obstante, si el área de selección contiene un porcentaje de monocitos superior o igual al 3 %, el software reduce o restringe automáticamente el área de selección de dispersión de la luz para recoger un porcentaje superior o igual al 95 % de los linfocitos incluidos en la muestra.

El software identifica y calcula los porcentajes de monocitos, granulocitos y residuos contaminantes que están incluidos en el área de análisis de linfocitos de BD Leucogate™ basándose en las propiedades de FSC, SSC y fluorescencia. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Software User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Software) para obtener información detallada sobre cómo el software define las áreas de selección y ajusta automáticamente los porcentajes de subpoblaciones mediante el uso de la pureza porcentual de la población de linfocitos del área de selección.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

La presencia de blastocitos puede afectar al procedimiento de definición de áreas de selección y provocar un fallo de procesamiento. Por tanto, las muestras que contienen blastocitos pueden hacer necesario un análisis mediante otros métodos. Si el software no puede definir un área de selección, se mostrará un mensaje en la copia impresa. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte) para ver un listado completo de mensajes de error del software.

El software utiliza el control negativo, reactivo B, para definir los marcadores de fluorescencia 1 (FL1) y fluorescencia 2 (FL2) alrededor de la población de linfocitos negativos, así como para evaluar el grado de unión de anticuerpos inespecífica de antígenos (tinción inespecífica) presente, especialmente aquella causada por receptores Fc. Cuando más del 5 % de los eventos de control negativo se encuentre por encima de los marcadores de control negativo de FL1 o FL2, se mostrará un mensaje de error «too much nonspecific staining» (demasiada tinción inespecífica) en la pantalla del ordenador y en la impresión del laboratorio para el tubo de control negativo. Durante el procesamiento del tubo de control negativo por parte del software, el operador debe comprobar si aparecen mensajes de error en la pantalla que indiquen la presencia de tinción inespecífica.

El control negativo es una mezcla de anticuerpos monoclonales conjugados con los mismos fluorocromos (FITC y PE) que los reactivos del análisis. Los anticuerpos de control negativo son específicos de antígenos no presentes en los leucocitos humanos. El control debe utilizarse para teñir una parte alícuota separada de cada muestra del paciente.

Para cada muestra del paciente, el área de selección de linfocitos definida con BD Leucogate™ y los marcadores de fluorescencia determinados con el control se utilizan para analizar los tubos de C a F restantes. Cuando se ha seleccionado la opción Percent Lymphocyte Conversion (Porcentaje de conversión de linfocitos) en el Main Menu (Menú principal) del software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, los resultados se expresan como porcentajes de linfocitos del área de selección de análisis. Si no se selecciona esta opción del software, los resultados se expresarán como porcentajes de los eventos totales del área de selección. El software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte proporciona un informe que cuantifica las subpoblaciones de linfocitos significativos desde el punto de vista inmunológico como porcentajes de los linfocitos humanos circulantes totales y la proporción de linfocitos T colaboradores/supresores ($CD3^+CD4^+$/ $CD3^+CD8^+$).

Con fines de control de calidad, una fórmula leucocitaria en tres partes con porcentajes de monocitos, granulocitos y linfocitos se determina automáticamente mediante el software y se imprime solamente para compararla con los resultados de una fórmula leucocitaria de laboratorio. Para obtener una fórmula leucocitaria en tres partes, el software utiliza un algoritmo para distinguir las tres poblaciones celulares basándose en la FSC, la SSC y la fluorescencia. Los monocitos son positivos para CD14 y tienen una señal de SSC intermedia entre la de los linfocitos y los granulocitos. Los linfocitos muestran una señal de SSC baja, mientras que la de los granulocitos es alta.

NOTA La fórmula leucocitaria en tres partes proporcionada por el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte debe utilizarse solamente para realizar una comparación con una fórmula leucocitaria independiente con fines de control de calidad y no debe sustituir a una fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente en las historias clínicas de los pacientes ni introducirse en el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte para obtener recuentos absolutos.

4. REACTIVOS

Reactivos suministrados, suficientes para 50 análisis

Los reactivos de A a F contienen dos anticuerpos monoclonales murinos, uno de ellos conjugado con FITC y el otro con PE. Cada reactivo de anticuerpo, suficiente para 50 análisis, se suministra en 1 ml de solución

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

salina tamponada con gelatina y azida sódica al 0,1 %. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante estirpes celulares obtenidas de la fusión de células de mieloma de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c. La relación fluoresceína-proteína (F:P) para los reactivos de anticuerpos monoclonales IgG de BD es de 2–5. La proporción F:P para cada reactivo se ha optimizado para su uso previsto.

Reagent A, BD Leucogate™ CD45/CD14, 1 ml

Se utiliza BD Leucogate™ CD45/CD14 para definir y evaluar la ventana de adquisición de dispersión de la luz que distingue los linfocitos de los granulocitos, monocitos, residuos y eritrocitos no lisados o nucleados. Este reactivo contiene CD45 marcado con FITC, clon 2D1,[28–30] para la identificación de leucocitos, y CD14 marcado con PE, clon MϕP9,[31–33] para la identificación de monocitos.

El anticuerpo CD45 se obtuvo de la hibridación de células de mieloma de ratón NS-1 con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). El anticuerpo está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón. El antígeno está presente en todos los leucocitos humanos, incluidos linfocitos, monocitos, granulocitos, eosinófilos y basófilos de la sangre periférica, y desempeña un papel importante en la transducción de señales, al modificar las señales de otras moléculas de superficie.[34] Se ha informado de que el anticuerpo CD45 reacciona débilmente frente a los eritrocitos circulantes maduros y plaquetas.[12,34] El anticuerpo CD45 reconoce los antígenos de leucocitos humanos, de 180–220 kilodaltons (kDa), que pertenecen a la familia T200.[34]

El anticuerpo CD14 se obtuvo de la hibridación de células de mieloma Sp2/0 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con monocitos de sangre periférica de un paciente con artritis reumatoide. El anticuerpo está compuesto por cadenas pesadas de IgG_{2b} y cadenas ligeras kappa de ratón. El anticuerpo CD14 reconoce un antígeno de monocito humano de 53 kDa.[35] El antígeno CD14 está presente en la mayoría de los monocitos de sangre periférica normal.[36] El anticuerpo CD14 reacciona débilmente frente a los granulocitos.[37]

Reactivo B, control, 1 ml

El reactivo de control se utiliza para definir los marcadores de cuadrante FL1 y FL2 alrededor de la población de linfocitos (negativos) no teñida de referencia, así como para evaluar el grado de unión de anticuerpos inespecífica de antígenos (tinción inespecífica) presente, especialmente aquella causada por receptores Fc. Contiene IgG_1 marcada con FITC, clon X40, e IgG_{2a} marcada con PE, clon X39.

Tanto el clon X40 como el clon X39 reaccionan específicamente a hemocianina de lapa californiana (KLH), un antígeno no expresado en células o estirpes celulares humanas. Los clones X40 y X39 se obtienen de la hibridación de células de mieloma Sp2/0-Ag14 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con KLH. El clon X40 está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón. El clon X39 está compuesto por cadenas pesadas de IgG_{2a} y cadenas ligeras kappa de ratón.

Reactivo C, CD3/CD19, 1 ml

CD3/CD19 se utiliza para identificar linfocitos T y B. Contiene CD3 marcado con FITC, clon SK7,[38–41] para la identificación de linfocitos T, y CD19 marcado con PE, clon 4G7,[42] para la identificación de linfocitos B.

El anticuerpo CD3 se obtuvo de la hibridación de células de mieloma NS-1 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con timocitos humanos. El anticuerpo está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón. El anticuerpo CD3 reacciona con la cadena épsilon del complejo CD3/receptor del antígeno de células T (TCR).[43] Este complejo está formado por al menos seis proteínas, con pesos moleculares de 20–30 kDa.[44] El antígeno reconocido por los anticuerpos CD3 se asocia de forma no covalente a TCR α/β o γ/δ (de 70–90 kDa).[45]

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

El anticuerpo CD19 se obtuvo de la hibridación de células de mieloma P3-X63-Ag8.653 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con células de leucemia linfocítica crónica humanas. El anticuerpo está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón. El antígeno reconocido por los anticuerpos CD19 está presente en los linfocitos B humanos en todas las fases de maduración, pero se pierde en las células plasmáticas. El antígeno CD19 puede intervenir en la activación y proliferación de linfocitos B. El peso molecular del antígeno reconocido por este anticuerpo es de 90 kDa.[46]

Reactivo D, CD3/CD4, 1 ml

CD3/CD4 se utiliza para identificar linfocitos T colaboradores/inductores. Esta combinación de reactivos permite separar los monocitos $CD3^-CD4^+$ del cuadrante 1 (consulte la figura 1 en la página 13 para ver la definición de cuadrante) de los linfocitos T colaboradores/inductores $CD3^+CD4^+$ del cuadrante 2 (consulte la figura 2 en la página 14). Contiene CD3 marcado con FITC, clon SK7 para la identificación de linfocitos T y CD4 marcado con PE, clon SK3[31,47] para la identificación de linfocitos T colaboradores/inductores.

El anticuerpo CD4 se obtuvo de la hibridación de células de mieloma NS-1 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con linfocitos T de sangre periférica humana. Está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón. El anticuerpo CD4 reconoce el antígeno CD4, que interactúa con las moléculas CHP de clase II y es el principal receptor del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).[48,49] La parte citoplásmica del antígeno se asocia con la proteína tirosina quinasa $p56^{lck}$. El antígeno CD4 puede regular la función del complejo de antígeno CD3/TCR.[50] El anticuerpo CD4 reacciona con monocitos/macrófagos, que tienen una densidad de antígeno CD4 inferior a la de los linfocitos T colaboradores/inductores.[51]

Reactivo E, CD3/CD8, 1 ml

CD3/CD8 se utiliza para identificar linfocitos T supresores/citotóxicos. Esta combinación de reactivos permite separar los linfocitos citolíticos naturales $CD3^-CD8^+$ del cuadrante 1 de los linfocitos T supresores/citotóxicos $CD3^+CD8^+$ del cuadrante 2 (consulte la figura 2 en la página 14). Contiene CD3 marcado con FITC, clon SK7 para identificar linfocitos T y CD8 marcado con PE, clon SK1[31] para identificar linfocitos T supresores/citotóxicos.

El anticuerpo CD8 se obtiene de la hibridación de células de mieloma NS-1 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con linfocitos T de sangre periférica humana. Está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón. El antígeno CD8 está presente en la subpoblación de linfocitos T supresores/citotóxicos humanos,[39,47] así como en una subpoblación de linfocitos citolíticos naturales.[26] El antígeno CD8 determinante interactúa con las moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (CHP) de clase I, dando como resultado una mayor adhesión entre los linfocitos T $CD8^+$ y las células diana.[52–54] La unión del antígeno CD8 con las moléculas del CHP de clase I mejora la activación de los linfocitos T en reposo.[52–55] El antígeno CD8 se expresa como un complejo bimolecular con puentes disulfuro con una subunidad α de 32 kDa.[56,57] El dominio citoplasmático de la subunidad α del antígeno CD8 se asocia con la proteína tirosina quinasa $p56^{lck}$.[54,55]

Reactivo F, CD3/CD16+CD56, 1 ml

El reactivo CD3/CD16+CD56 se utiliza para identificar linfocitos T y citolíticos naturales. Contiene también CD16 marcado con PE, clon B73.1[58–61] y CD56 marcado con PE, clon MY31,[62,63] para garantizar la identificación de la población de linfocitos citolíticos naturales. Puesto que algunos linfocitos T también expresan los antígenos CD16 o CD56, o ambos, el reactivo contiene también CD3 marcado con FITC para identificar linfocitos T y la subpoblación de linfocitos T que expresa los antígenos CD16 y/o CD56.[64]

El anticuerpo CD16 se obtuvo de la hibridación de células de mieloma P3-X63-Ag8.653 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con linfocitos citolíticos naturales. El anticuerpo está compuesto

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón.[58–60] El antígeno reconocido por los anticuerpos CD16 es una proteína de 50 a 65 kDa que es el receptor para el Fc III de la IgG presente en los linfocitos citolíticos naturales y neutrófilos.[61]

El anticuerpo CD56 se obtuvo de la hibridación de células de mieloma Sp2/0 de ratón con células esplénicas de ratones $(B6xBALB/c)F_1$ inmunizados con la estirpe celular KG-1a. El anticuerpo está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón. El antígeno CD56 está presente en los linfocitos citolíticosnaturales.[64,65] El anticuerpo reconoce la isoforma de 140 kDa de la molécula de adhesión celular neural (NCAM).[61,63] La proteína central de 140 kDa está extensamente glucosilada para dar un antígeno maduro.[62,64] El antígeno CD56 está presente básicamente en todos los linfocitos citolíticos naturales $CD16^+$ en reposo y activados, así como aproximadamente en el 5 % de los linfocitos de sangre periférica $CD3^+$.[65] La densidad del antígeno CD56 aumenta cuando los linfocitos citolíticos naturales están activados.[66] Los linfocitos T $CD3^+CD56^+$ forman una subpoblación única de linfocitos T citotóxicos que media en la citotoxicidad no restringida por el CPH.[65] El antígeno CD56 interviene en la adhesión de células homotípicas neuronales y en la diferenciación celular durante la embriogénesis.[62]

Reactivo G, BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Lysing Solution 10X, 60 ml

El reactivo G contiene solución de lisado tamponada (10X), con menos del 50 % de dietilenglicol y menos del 10 % de formaldehído. Cuando se conserva a una temperatura de 2–25 °C, el concentrado 10X es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Para usarlo, diluya a 1:10 con agua apta para reactivos a temperatura ambiente (20–25 °C). La solución preparada se mantendrá estable durante 1 mes si se conserva en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente.

Reactivo	Componente	Concentración (µg/ml)
A	CD45	25
	CD14	12,5
B	IgG_1	12,5
	IgG_{2a}	12,5
C	CD3	25
	CD19	3,1
D	CD3	25
	CD4	1,5
E	CD3	25
	CD8	6,25
F	CD3	25
	CD16	6,25
	CD56	12,5

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Precauciones

- Para uso diagnóstico in vitro.
- Cuando se almacenan a una temperatura de 2–8 °C, los reactivos de anticuerpos se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No se debe utilizar después de la fecha de caducidad.
- Los reactivos de anticuerpos no se deben congelar ni exponer a la luz directa durante el almacenamiento o la incubación con células. Mantenga seco el vial del reactivo.
- Si se utilizan temperaturas o tiempos de incubación o centrifugación distintos de los especificados, pueden producirse errores.
- Para obtener resultados óptimos, tiña las muestras de sangre en las 6 horas siguientes a la venopunción.
- La alteración en el aspecto de cualquiera de los reactivos, como la precipitación o decoloración, es un indicio de inestabilidad o deterioro. En ese caso, no utilice el reactivo.
- Los reactivos de anticuerpos contienen azida sódica como conservante. Sin embargo, es preciso extremar las precauciones para evitar la contaminación microbiana, que podría causar resultados erróneos.
- El reactivo G contiene 2,2´-oxibisetanol (dietilenglicol) al 31,345 %, número CAS 111-46-6; formaldehído al 9,77 %, número CAS 50-00-0; y metanol al 3,433 %, número CAS 67-56-1. La solución de lisado se clasifica como peligrosa según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA).

  Visite regdocs.bd.com/regdocs/sdsSearch para descargar la ficha de datos de seguridad.

	Peligro
	H302+H312+H332: Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación. H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H341: Se sospecha que provoca defectos genéticos. H350: Puede provocar cáncer. H371: Puede provocar daños en los órganos. H373: Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas. H402: Nocivo para los organismos acuáticos.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

Prevención	P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P271: Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado. P264: Lavarse concienzudamente tras la manipulación. P270: No comer, beber ni fumar durante su utilización. P260: No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. P272: Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo. P201: Solicitar instrucciones especiales antes del uso. P202: No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. P281: Utilizar el equipo de protección individual obligatorio. P273: Evitar su liberación al medio ambiente.
Respuesta	P304+P340: EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. P303+P361+P353: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse. P333+P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. P301+P312: EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico si la persona se encuentra mal. P330: Enjuagarse la boca. P331: NO provocar el vómito. P310: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P321: Se necesita tratamiento específico (ver instrucciones complementarias de primeros auxilios en la ficha de datos de seguridad). P363: Lavar las prendas contaminadas antes de volver a usarlas.
Conservación	P405: Guardar bajo llave.
Eliminación	P501: Eliminar el contenido/el recipiente en una planta aprobada de acuerdo con las reglamentaciones locales, regionales, nacionales e internacionales.

ADVERTENCIA Se consideran de riesgo biológico todas las muestras biológicas y todos los materiales que hayan entrado en contacto con ellas. Manipular como si pudieran transmitir alguna infección[67,68] y desechar tomando las precauciones adecuadas según la normativa federal, estatal y local. Nunca pipetee con la boca. Utilice ropa protectora, protección ocular y guantes adecuados.

5. INSTRUMENTO

El BD Simultest™ IMK-Lymphocyte se ha diseñado para utilizarse en un citómetro de flujo de BD equipado con el hardware, el software y la electrónica de conmutación informáticos adecuados. El citómetro de flujo debe estar equipado para detectar fluorescencia bicolor, dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC).

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Todas las características de rendimiento se obtuvieron utilizando el BD FACScan™ y se verificaron en el BD FACStrak™. Otros sistemas pueden tener características distintas, por lo que deben ser verificados por el usuario.

Se recomienda utilizar el siguiente sistema de instrumentos:

- Sistema de citómetro de flujo BD FACScan™ o BD FACStrak™ equipado para detección de fluorescencia bicolor y detección de dispersión de la luz de dos parámetros. Para obtener información de uso detallada, consulte los documentos *BD FACScan™ User's Guide* (Guía del usuario de BD FACScan™) o *BD FACStrak™ User's Guide* (Guía del usuario de BD FACStrak™).
- Sistema informático BD CONSORT™ 30 o BD CONSORT™ 32 y periféricos (incluidos en el sistema BD FACScan™) o sistema informático BD CONSORT™ 31 y periféricos (incluidos en el sistema BD FACStrak™). Para obtener información de uso detallada, consulte los documentos *BD CONSORT™ 30 Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD CONSORT™ 30), *BD CONSORT™ 32 System User's Guide* (Guía del usuario del sistema BD CONSORT™ 32) o *BD CONSORT™ 31 System User's Guide* (Guía del usuario del sistema BD CONSORT™ 31).
- Software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte. Para obtener información de uso detallada, consulte el documento *BD Simultest™ IMK-Lymphocyte User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte).
- BD Calibrite™ Beads (n.° de catálogo 349502). Estas microesferas se utilizan para configurar los voltajes de tubo fotomultiplicador (PMT), ajustar la compensación de fluorescencia, verificar la sensibilidad del instrumento y supervisar el rendimiento del citómetro de flujo. Para obtener información de uso detallada, consulte las instrucciones de uso de las BD Calibrite™ Beads.
- Software BD FACSComp™. Para obtener información de uso detallada, consulte el documento *BD FACSComp™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD FACSComp).

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Extraiga sangre asépticamente por venopunción[69,70] utilizando un BD Vacutainer® Blood Collection Tube de EDTA (tapón lavanda) estéril. Para este procedimiento se necesita como mínimo 1 ml de sangre completa. Para obtener resultados óptimos, la sangre debe teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. La sangre con anticoagulante puede almacenarse a temperatura ambiente (20–25 °C) durante un máximo de 6 horas, hasta que esté lista para la tinción. Las muestras de sangre refrigeradas antes de la tinción pueden dar resultados anómalos.

Deben hacerse un hemograma de leucocitos y una fórmula leucocitaria a partir de la misma muestra de sangre completa antes de la tinción. Se considera aceptable un intervalo de concentración de leucocitos de $3{,}5 \times 10^3$–$9{,}4 \times 10^3$ leucocitos/µl. Las muestras con recuentos superiores a $9{,}4 \times 10^3$ leucocitos/µl puede que tengan que diluirse con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X que contenga azida sódica al 0,1 %; consulte la disponibilidad a su representante de BD Biosciences local. Para muestras con recuentos inferiores a $3{,}5 \times 10^3$ leucocitos/µl podría ser necesaria más sangre, así como un procedimiento de separación para concentrar las células.

Condiciones que causan interferencias

No deben utilizarse muestras de pacientes previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre completa refrigeradas antes de la tinción pueden dar resultados anómalos. Para obtener resultados óptimos, las muestras de sangre deben teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. Las muestras obtenidas de pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores pueden ofrecer una escasa

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

diferenciación.[71] La presencia de blastocitos o de eritrocitos no lisados o nucleados puede interferir en los resultados del análisis. Las muestras hemolizadas deben rechazarse. Siga las indicaciones del fabricante del tubo de recogida para conocer cuál es el volumen mínimo de sangre que se debe recoger.

PRECAUCIÓN Tome las precauciones habituales al recoger, manipular y desechar todas las muestras de sangre humana y reactivos potencialmente cancerígenos.

7. PROCEDIMIENTO

Reactivos suministrados

Consulte Reactivos suministrados, suficientes para 50 análisis y Precauciones en la sección 4, Reactivos.

Reactivos y materiales necesarios pero no suministrados

- BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tubes o equivalentes.
- Tubos de ensayo Falcon desechables de poliestireno de 12 × 75 mm o equivalentes.
- Agitador vorticial.
- Centrifugadora de baja velocidad (velocidad mínima 200 *g*) con rotor de cesto giratorio y soportes para tubos de 12 × 75 mm.
- Aspirador de vacío con depósito.
- Micropipeta con puntas.
- Un tampón de lavado de PBS con azida sódica al 0,1 %.
- Solución fijadora (solución de paraformaldehído [PFA] al 1 % en PBS 1X con azida sódica al 0,1 %).

  Almacene a una temperatura de 2–8 °C en un recipiente de vidrio ámbar durante un máximo de 1 semana.
- BD FACSFlow™ Sheath Fluid (n.º de catálogo 342003) o equivalente.

  PRECAUCIÓN Utilice únicamente diluyente BD FACSFlow™ Sheath Fluid para diluir BD Calibrite™ Beads.
- Agua apta para reactivos (destilada y desionizada).

Tinción y fijación de las células

Las muestras de sangre completa se tiñen en primer lugar con los reactivos de A a F. El reactivo G diluido se utiliza para lisar los eritrocitos después de la tinción. Consulte Condiciones que causan interferencias en la sección 6, Recogida y preparación de muestras y sección 9, Limitaciones. Evite exponer los tubos a la luz directa. Realice el procedimiento a temperatura ambiente (20–25 °C) utilizando reactivos a temperatura ambiente. Consulte el punto Precauciones en la sección 4, Reactivos.

1. Para cada muestra de paciente, etiquete seis tubos de 12 × 75 mm como A, B, C, D, E y F. Además, etiquete cada tubo con el número de identificación de la muestra.
2. Ponga 20 µl de Reactivo A en el tubo A, 20 µl de Reactivo B en el tubo B, 20 µl de Reactivo C en el tubo C, 20 µl de Reactivo D en el tubo D, 20 µl de Reactivo E en el tubo E y 20 µl de Reactivo F en el tubo F.
3. Para cada tubo de muestra, utilice una punta de micropipeta nueva y añada con cuidado 100 µl de sangre completa con anticoagulante bien mezclada en el fondo de cada uno de los tubos etiquetados. La concentración de leucocitos recomendada es de $3,5 \times 10^3$–$9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl. Agite a conciencia

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 12345

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

NOTA Proteja las muestras de la luz directa durante este procedimiento de incubación y tenga cuidado para evitar que se vierta sangre por el lateral del tubo. Si queda sangre completa en el lateral del tubo, no se teñirá con el reactivo.

4. Diluya la solución Lysing Solution 10X a 1X siguiendo las instrucciones para el reactivo G en la sección 4. Añada 2 ml de Lysing Solution 1X a temperatura ambiente (20–25 °C) en cada tubo. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 10 a 12 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (20–25 °C). No incube durante más de 12 minutos.

   NOTA Evite la exposición prolongada de las células a los reactivos líticos, ya que podría provocar la destrucción de leucocitos. Consulte la sección 9, Limitaciones en la página 20.

5. Inmediatamente después de la incubación, centrifugue los tubos a 300 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

6. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.

7. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para volver a suspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 2 ml de PBS con azida sódica al 0,1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Centrifugue a 200 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

8. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.

9. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para resuspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 0,5 ml de solución de paraformaldehído al 1 % en PBS 1X con azida sódica al 0,1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Compruebe que las células estén bien mezcladas con la solución fijadora.

10. Las células ya están listas para analizarse en el citómetro de flujo. Tape o cubra los tubos preparados y almacénelos a una temperatura de 2–8 °C en un lugar oscuro hasta el momento del análisis por citometría de flujo. Analice las células fijadas en las 24 horas posteriores a la tinción. Agite a conciencia las células en el agitador vorticial a baja velocidad para reducir la agregación celular antes de realizar el análisis con el citómetro de flujo.[13]

Citometría de flujo

Siga las instrucciones de BD para el análisis por citometría de flujo bicolor y consulte la sección 5, Instrumento. Se recomienda utilizar el método general siguiente. El citómetro de flujo BD se prepara en primer lugar para el análisis de la muestra utilizando BD Calibrite™ Beads y el software BD FACSComp™.

Las muestras teñidas se procesan después en el citómetro de flujo y se analizan con el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte. Consulte los documentos *BD FACScan™ User's Guide* (Guía del usuario de BD FACScan™) o *BD FACStrak™ User's Guide* (Guía del usuario de BD FACStrak™), las instrucciones de uso de BD Calibrite™ Beads, *BD FACSComp™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD FACSComp) y *BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte) para obtener instrucciones de uso detalladas. Es aconsejable guardar los datos del paciente en modo de lista para permitir posteriores análisis de los archivos de datos.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Configure y ajuste la compensación del citómetro de flujo BD FACScan™ o BD FACStrak™. Mediante el uso de BD Calibrite™ Beads y el software BD FACSComp™, ajuste los voltajes de PMT y la compensación de fluorescencia, y compruebe la sensibilidad del detector. Para conocer más detalles, consulte las instrucciones de uso de *BD Calibrite™ Beads* , *BD FACSComp™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD FACSComp) y *BD FACScan™ User's Guide* (Guía del usuario de BD FACScan™) o *BD FACStrak™ User's Guide* (Guía del usuario de BD FACStrak™).

Procese todas las muestras con el citómetro de flujo y adquiera los datos en archivos de modo de lista utilizando el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte) para ver instrucciones detalladas de uso del software. El software recoge automáticamente un número de eventos suficiente para obtener un mínimo de 2000 linfocitos dentro del área de selección de linfocitos. El software cuenta el número de eventos que hay en cada cuadrante y luego calcula un porcentaje de eventos de linfocitos positivos para el cuadrante 1 (amarillo verdoso bajo/rojo anaranjado alto), el cuadrante 2 (amarillo verdoso alto/rojo anaranjado alto o fluorescencia dual), el cuadrante 3 (amarillo verdoso bajo/rojo anaranjado bajo) y el cuadrante 4 (amarillo verdoso alto/rojo anaranjado bajo) (consulte la figura 1).

Figura 1 Cuadrantes de la pantalla de fluorescencia (indicados como C1 a C4) y colores correspondientes

C1 Amarillo verdoso bajo/rojo anaranjado alto	**C2** Amarillo verdoso alto/rojo anaranjado alto (fluorescencia dual)
C3 Amarillo verdoso bajo/rojo anaranjado bajo	**C4** Amarillo verdoso alto/rojo anaranjado bajo

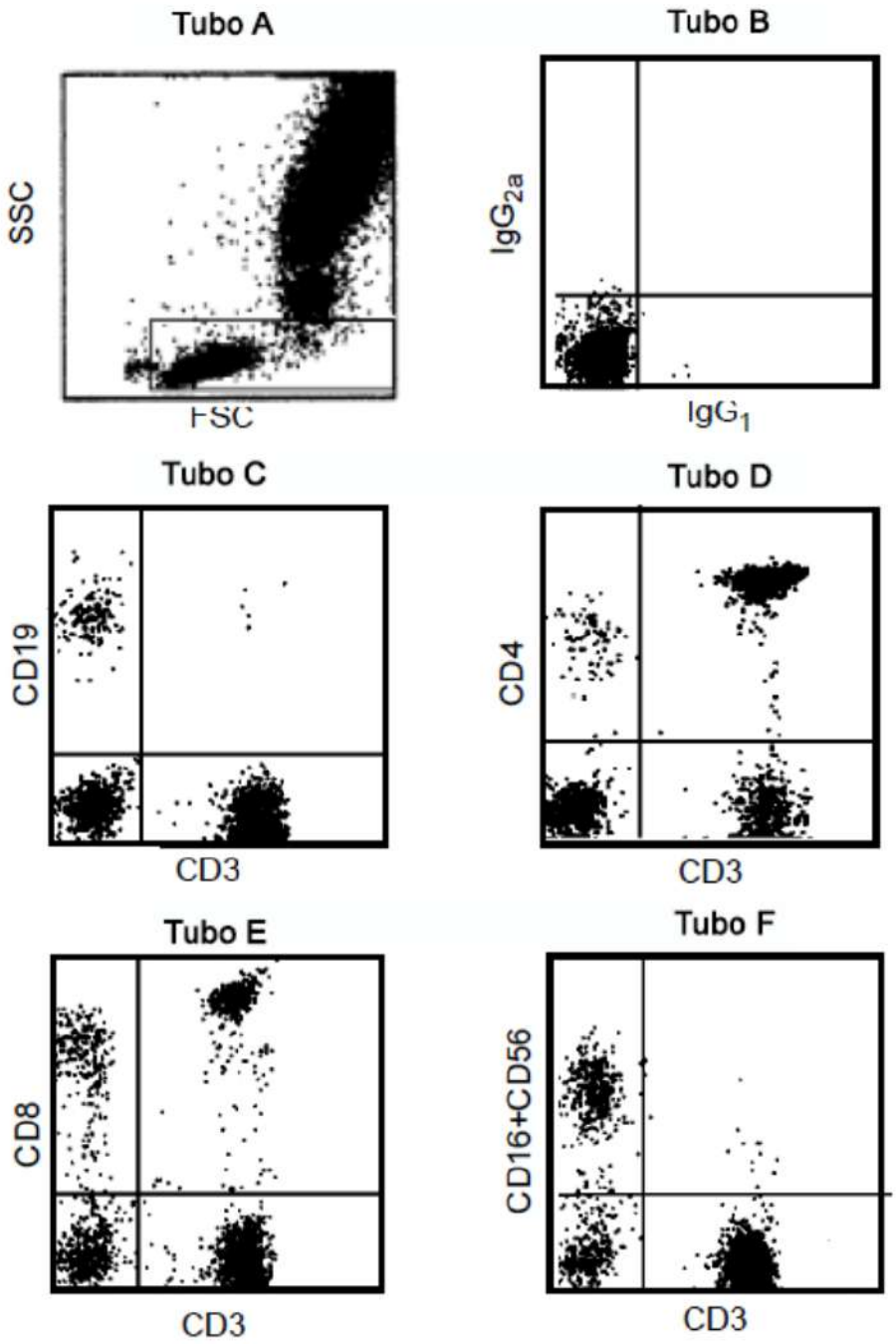
El tubo (A) de BD Leucogate™ se utiliza para fijar un área de selección en linfocitos. El BD FACScan™ o BD FACStrak™ con software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte define automáticamente un área de selección para análisis de linfocitos con el objetivo de eliminar la mayoría de los residuos, monocitos y granulocitos (consulte la figura 2). Consulte el documento BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Software User's Guide (Guía del usuario del software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte) para obtener información sobre el modo de definir el área de selección. Si la separación entre las poblaciones es inadecuada, se marcará la muestra para advertir al operador y se mostrará un mensaje. Una preparación insuficiente de la muestra o una calibración incorrecta del instrumento pueden contribuir a que se produzcan errores en las áreas de selección de muestras.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 135 de 196

Figura 2 Muestra de LWB de BD FACScan™ de un paciente normal desde el punto de vista hematológico teñida con reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte. Se utilizó BD Leucogate™ CD4/CD19 para reducir los residuos, monocitos y granulocitos en la ventana de adquisición que se muestra correspondiente al tubo A. Se muestran gráficos de puntos de FL1 (eje X) frente a FL2 (eje Y) correspondientes a los tubos B–F.



El tubo de control (B) se utiliza para definir los marcadores de intensidad de fluorescencia y ofrece una indicación de tinción inespecífica. El software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte utiliza automáticamente el

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 136 de 196

área de selección para análisis de linfocitos definida con BD Leucogate™ CD45/CD14, y luego establece la colocación de los marcadores de FL1 y FL2. Estos marcadores definen los límites entre los eventos negativos y los eventos teñidos positivamente de el área de selección de linfocitos. Se deben ajustar los marcadores de fluorescencia alrededor de la población negativa que se muestra como el grupo de sucesos bajos, tanto en fluorescencia amarilla verdosa como roja anaranjada.

Los datos de los tubos C, D, E y F se adquieren y analizan mediante el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte utilizando el área de selección y los marcadores establecidos con los tubos A y B. Las poblaciones de linfocitos presentes en cada cuadrante para cada tubo se muestran en la tabla 1. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte) para obtener información sobre el modo de definir el área de selección. Analice estos resultados utilizando los criterios proporcionados en Control de calidad y de acuerdo con las instrucciones de la sección 8, Resultados.

Tabla 1 Poblaciones de células mononucleares separadas por cuadrante para los tubos C–F

	Cuadrante			
Tubo	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**
C:CD3/CD19	Linfocitos B $CD3^-$ $CD19^+$	Tinción inespecífica[a] de $CD3^+CD19^+$	Linfocitos $CD3^-CD19^-$, monocitos, granulocitos y residuos	Linfocitos T $CD3^+CD19^-$
D: CD3/CD4	Monocitos $CD3^-$ $CD4^+$	Linfocitos T colaboradores/inductores $CD3^+CD4^+$	Linfocitos $CD3^-CD4^-$, granulocitos y residuos	Linfocitos T $CD3^+CD4^-$
E:CD3/CD8	$CD3^-CD8^+$ CD3–CD8+	Linfocitos T supresores/citotóxicos $CD3^+CD8^+$	Linfocitos $CD3^-CD8^-$, monocitos, granulocitos y residuos	$CD3^+CD8^-$ Linfocitos T
F: CD3/CD16+ CD56	Linfocitos citolíticos naturales $CD3^-$ $/CD16^+$ y/o $CD56^+$, granulocitos	Subpoblación de linfocitos T $CD3^+/CD16^+$ y/o $CD56^+$	Linfocitos $CD3^{-/}CD16^-$ $CD56^-$, monocitos y residuos	Linfocitos T $CD3^+/CD16^-$ y $CD56^-$

a. Consulte la sección 9, Limitaciones.

Control de calidad

Para obtener resultados óptimos, se recomienda utilizar BD Calibrite™ Beads y el software AutoComp™ para configurar los voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT), ajustar la compensación de fluorescencia y verificar la sensibilidad del instrumento antes de usar BD Simultest™ IMK-Lymphocyte en el citómetro de flujo BD FACScan™ o BD FACStrak™.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Se recomienda analizar diariamente una muestra de control de un sujeto adulto normal para optimizar los parámetros del instrumento y como comprobación de control de calidad del sistema. En la figura 2 se ilustran los resultados correctos para un paciente normal desde el punto de vista hematológico.

Los controles negativos se procesan con cada muestra de paciente para definir los marcadores de FL1 y FL2 entre los grupos de linfocitos negativos y los teñidos positivamente, así como para detectar la presencia de tinción inespecífica, que indicaría resultados erróneos del paciente. Examine la pantalla del ordenador y el informe de laboratorio para el tubo de control B. Si más del 5 % de los eventos se encuentra fuera del C3 para el tubo de control, se muestra un mensaje «too much nonspecific staining» (demasiada tinción inespecífica) para el tubo B. En este caso, los resultados para los tubos de C a F deben considerarse no fiables. Consulte la sección Solución de problemas al final de estas instrucciones de uso. Es necesario realizar un examen visual de los gráficos de puntos de los tubos de C a F para garantizar que los marcadores de fluorescencia estén correctamente definidos y que la tinción inespecífica sea mínima.

Examine visualmente el gráfico de puntos correspondiente al tubo de control B. Si el grupo negativo es difuso y está esparcido por el intervalo de intensidad de FL2, puede que el marcador no se haya ajustado correctamente y que los resultados no sean fiables.

Si se observa una separación escasa entre los grupos positivo y negativo en el examen visual de los gráficos de puntos del control normal, especialmente para CD3 y CD4, puede deducirse que hay tinción inespecífica o que la tinción es incompleta, y deberá rechazarse el análisis. La tinción inespecífica puede deberse a un mal estado de las células. Consulte la sección 12, Solución de problemas, si observa tinción inespecífica o no óptima. El software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte comprueba automáticamente que coincidan los porcentajes de linfocitos T entre los tubos que contienen CD3 (tubos C, D, E y F). Se rechazará el análisis si el valor total de linfocitos T en dos tubos cualesquiera difiere en más de un 8 %.

La uniformidad interna del ensayo se puede indicar cuando los porcentajes totales de linfocitos T, B y citolíticos naturales es del 100 % ±5 % cuando se utiliza la opción Percent Lymphocyte Conversion (Porcentaje de conversión de linfocitos) con el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK-Lymphocyte User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte) para obtener instrucciones cuando seleccione esta opción.

El software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte examinará automáticamente los datos y alertará al operador mediante una serie de posibles mensajes de error. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK-Lymphocyte User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte) para obtener una lista de los posibles mensajes. Utilice los criterios siguientes para el examen de los gráficos de puntos obtenidos para cada muestra con el fin de evaluar la calidad de los datos obtenidos.

1. El operador debe rechazar los resultados si recibe uno o más de los mensajes de error siguientes para el control normal: no separation between cellular populations (no hay separación entre poblaciones celulares); too few lymphocytes (less than 500) (linfocitos demasiado escasos [menos de 500]); excessive RBC or nucleated RBC contamination and debris (greater than 10%) (contaminación con eritrocitos excesivos o eritrocitos nucleados y residuos [superior al 10 %]); o excessive monocyte (greater than 3%) or granulocyte (greater than 6%) contamination of the lymphocyte gate (contaminación excesiva con monocitos [superior al 3 %] o granulocitos [superior al 6 %] del área de selección de linfocitos).
2. Si no hay un motivo obvio para que falle el control normal, debe teñirse y procesarse una muestra de otro control normal, y repetirse todo el procedimiento de tinción en todas las muestras siguientes.
3. Las muestras con eritrocitos nucleados pueden contener un exceso de residuos debido a una lisis incompleta de estos con la solución de lisado (reactivo G). El exceso de residuos puede suceder también cuando se analizan muestras de sangre de pacientes que padecen determinadas alteraciones

ARTEAGA ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

hematológicas que dificultan la lisis de los eritrocitos, como mielofibrosis y esferocitosis. Los eritrocitos nucleados se contarán como residuos y, si estos superan el 10 %, el software marcará la muestra como «too many nonlymphs in gate» (demasiadas células distintas de linfocitos en el área de selección) y sus resultados deberán rechazarse.

4. La diferencia entre tubos en los eventos incluidos en el área de selección debe ser inferior o igual a 500 eventos para todos los tubos del panel, excepto para el tubo de BD Leucogate™ (A). (Sin embargo, si el tubo de control presenta problemas, el panel no será fiable). Consulte también la sección Solución de problemas al final de estas instrucciones de uso.

8. RESULTADOS

Porcentaje de conversión de linfocitos

Cuando se selecciona la opción de software Percent Lymphocyte Conversion (Porcentaje de conversión de linfocitos), el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte calcula cada subpoblación de linfocitos informada como un porcentaje de los linfocitos incluidos en el área de selección para análisis de linfocitos basándose en el porcentaje de linfocitos determinado con el tubo de BD Leucogate™ A. El software también resta las células distintas de linfocitos de C3. Consulte el documento BD *Monoclonal Antibodies Source Book* (Manual de referencia de anticuerpos monoclonales de BD), sección 8.3.

Cuando se han cumplido todos los criterios de control de calidad indicados en la sección 7, Procedimiento, la opción del software Percent Lymphocyte Conversion (Porcentaje de conversión de linfocitos) proporciona cálculos apropiados de los valores de subpoblaciones válidos. Sin embargo, si no se cumplen los criterios de control de calidad (por ejemplo, contaminación por células distintas de linfocitos excesivas del área de selección), puede que los resultados no sean fiables. En este caso, es necesario analizar los datos manualmente para determinar el efecto de las células distintas de linfocitos con reactividad cruzada en los resultados. Si la opción Percent Lymphocyte Conversion (Porcentaje de conversión de linfocitos) se desactiva, los resultados se indicarán como un porcentaje de los eventos totales incluidos en el área de selección. (Consulte los documentos *BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Software User's Guide* [Guía del usuario del software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte] o BD *Monoclonal Antibodies Source Book*, [Manual de referencia de anticuerpos monoclonales de BD], sección 8.3).

El principio del cálculo es el siguiente (los valores C hacen referencia a los recuentos en los cuadrantes):

N = número total de eventos en el área de selección de linfocitos definida por BD Leucogate™ = L + M + G + D, donde:

L = número de linfocitos en el área de selección

M = número de monocitos en el área de selección

G = número de granulocitos en el área de selección

D = número de eventos de residuos en el área de selección

Ecuación 1. Porcentaje de linfocitos en el área de selección (%L) = L/N × 100

La ecuación 1 calcula el porcentaje de eventos de linfocitos dentro del área de selección para análisis de linfocitos BD Leucogate™. Este valor se indica como «%L» en el tubo A en la tabla 2 y refleja la pureza de los linfocitos dentro del área de selección dibujada con el tubo de BD Leucogate™ (A).

Ecuación 2a. Porcentaje de linfocitos convertidos incluidos en el área de selección (Conv %L) en C1, C2 o C4 =

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

$$\frac{\text{Número de eventos del área de selección en C1, C2 o C4}}{\text{N x (\%L/100)}} \times 100$$

El software utiliza la ecuación 2a para calcular el porcentaje de linfocitos convertidos para C1, C2 y C4. Presupone que todas las células distintas de linfocitos están sin teñir y se muestran en C3.

NOTA La opción Percent Lymphocyte Conversion (Porcentaje de conversión de linfocitos) no corrige los eventos de células distintas de linfocitos que pueden ocurrir en C1, C2 y C4. Por tanto, el software no corrige los eventos de granulocitos $CD16^+$ en C1.

Ecuación 2b. Porcentaje de linfocitos convertidos incluidos en el área de selección (Conv %L) en C3 =

$$\frac{\text{(Número de eventos del área de selección en C3 - Número de células distintas de linfocitos en el área de selección)}}{\text{N x (L/100)}} \times 100$$

donde:

Número de células distintas de linfocitos en el área de selección = número de eventos de residuos en el área de selección + número de granulocitos en el área de selección + número de monocitos en el área de selección. Consulte la tabla 2, tubo A.

El software utiliza la ecuación 2b para calcular el porcentaje de linfocitos convertidos para C3. Puesto que presupone que todas las células distintas de linfocitos se encuentran en este cuadrante, las resta del número de eventos del área de selección que están en C3 y expresa el resto como un porcentaje de los linfocitos incluidos en el área de selección.

En la tabla 2 se resumen los datos de la figura 2.

Tabla 2 Resumen de los datos representativos de la figura 2 e identificación de los cuadrantes utilizados para calcular subpoblaciones

Tubo	%L[a]	%M[a]	%G[a]	%D[a]	% de linfocitos totales en el área de selección[b]
A	95	1	3	1	99

a. %L, M, G y D se refieren a los linfocitos, los monocitos, los granulocitos y los residuos del área de selección de linfocitos definida por BD Leucogate™, expresados como porcentajes de eventos en el área de selección. Estos valores reflejan la calidad y la pureza del área de selección. Los datos se recogieron en un citómetro de flujo BD FACScan™.

b. El porcentaje del total de linfocitos en el área de selección son los linfocitos del área de selección definida por BD Leucogate™, expresados como un porcentaje de todos los linfocitos de la muestra fuera del área de selección. Este valor mide la proporción de todos los linfocitos incluidos en el área de selección.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

Tubo	Tipo de célula	Cuadrante (s)	% de linfocitos (%L convertidos)[a]	Proporción[b]
C: CD3/CD19	Linfocitos T totales	C4	74	—
	Linfocitos B totales	C1	7	—
D: CD3/CD4	Linfocitos T totales	C2 y C4	75	—
	Linfocitos T colaboradores/inductores	C2	52	—
E: CD3/CD8	Linfocitos T totales	C2 y C4	72	—
	Linfocitos T supresores/citotóxicos	C2	24	—
D,E: CD3/CD4; CD3/CD8	Linfocitos T colaboradores/inductores; supresores/citotóxicos	C2	—	2,2§
F: CD3/CD16 + CD56	Linfocitos T totales	C2 y C4	74	—
	Linfocitos citolíticos naturales	C1	16	—

a. Consulte la sección 8, «Resultados», para ver una explicación de Percent Lymphocyte Conversion (Porcentaje de conversión de linfocitos).

b. Proporción de linfocitos T colaboradores/supresores = (CD3+CD4+)/(CD3+CD8+).

En la tabla 3, se ofrecen datos representativos de la fórmula leucocitaria en tres partes obtenida de un donante adulto sano utilizando el BD FACScan™ con el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte.

Fórmula leucocitaria en tres partes

Para la sangre completa lisada, es posible estimar los monocitos, los linfocitos y los granulocitos como un porcentaje de los leucocitos utilizando el tubo (A) de BD Leucogate™ (consulte la tabla 2). El software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte calcula automáticamente una fórmula leucocitaria en tres partes (tabla 3). Consulte el documento *BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte) para obtener impresiones de los datos representativos.

NOTA La fórmula leucocitaria en tres partes proporcionada por el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte debe utilizarse solamente para realizar una comparación con una fórmula leucocitaria independiente con fines de control de calidad y no debe sustituir a una fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente en las historias clínicas de los pacientes ni introducirse en el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte para obtener recuentos absolutos.

Tabla 3 Datos representativos de la fórmula leucocitaria en tres partes obtenida de un donante adulto sano utilizando el BD FACScan™ con el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte

Fórmula leucocitaria en tres partes[a]	% de leucocitos
Linfocitos	21
Monocitos	5
Granulocitos	74

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

a. La fórmula leucocitaria en tres partes se obtiene mediante la expresión de los linfocitos, los monocitos y los granulocitos en toda la muestra fuera del área de selección como un porcentaje de la suma de los linfocitos, los monocitos y los granulocitos en toda la muestra.

Recuentos absolutos

Puede calcularse un recuento celular absoluto si se obtienen un recuento de leucocitos y el porcentaje de linfocitos de una fórmula leucocitaria independiente mediante procedimientos de laboratorio estándar. El software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte calcula automáticamente un recuento absoluto para cada subpoblación si el operador introduce un recuento de leucocitos y el porcentaje de linfocitos de una fórmula leucocitaria para cada muestra de sangre completa del paciente. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte). El principio del cálculo es el siguiente:

1. Introduzca el recuento de leucocitos en leucocitos/µl obtenido de la misma muestra de sangre.
2. Introduzca el porcentaje de linfocitos de una fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente obtenida de la misma muestra de sangre. No utilice los valores de fórmula leucocitaria en tres partes obtenidos con BD Simultest™ IMK-Lymphocyte.
3. Los recuentos absolutos para cada subpoblación se calculan después como en el ejemplo siguiente:
4. Recuento absoluto de $CD3^+CD4^+$ células/µl =

$$\frac{\text{Eventos } \%CD3^+CD4^+}{100} \times \frac{\%L}{100} \times (\text{Leucocitos}/\mu l)$$

Si los datos se presentan en recuentos absolutos, el valor y la precisión del intervalo de referencia del recuento absoluto estarán en función de (a) el intervalo de referencia normal del laboratorio y la precisión del recuento de leucocitos, (b) el porcentaje de linfocitos y (c) el intervalo de referencia normal y la precisión del porcentaje de linfocitos positivos para el marcador específico.

9. LIMITACIONES

- Utilice sangre recién recogida y tíñala en las 6 horas siguientes a la venopunción. Antes de la tinción, conserve la sangre a temperatura ambiente (20–25 °C). Las células que se han refrigerado antes de la tinción pueden dar resultados anómalos. No se recomienda utilizar células fijadas con anterioridad.
- Las células teñidas y fijadas deben analizarse en las 24 horas siguientes a la tinción.
- Las muestras de sangre completa con recuentos inferiores a $3,5 \times 10^3$ leucocitos/µl y superiores a $9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl pueden requerir una manipulación especial para obtener resultados correctos. Las muestras con recuentos superiores a $9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl puede que tengan que diluirse con PBS que contenga azida sódica al 0,1 %. Las muestras con recuentos inferiores a $3,5 \times 10^3$ leucocitos/µl pueden necesitar más sangre, así como un procedimiento de separación para concentrar las células.
- Algunas variables de confusión, como medicamentos que afectan a las propiedades de las células sanguíneas, pueden producir resultados inexactos.[71] Por ejemplo, se ha observado una escasa diferenciación entre las células positivas y negativas en pacientes sometidos a un transplante que han sido tratados con medicamentos inmunosupresores. Si se observa una separación escasa entre los grupos negativo y positivo, debe rechazarse el análisis (consulte Solución de problemas, al final de estas instrucciones de uso).

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 142 de 196

- Si la diferencia en el porcentaje de linfocitos T total de cualquier tubo difiere del porcentaje de linfocitos T total medio en más de un 8 %, el software imprime un aviso en el informe del médico. En este caso, debe rechazarse el análisis.
- Es necesario que los laboratorios definan sus propios intervalos de referencia normales para cada uno de los parámetros de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte que puedan verse afectados por el sexo o la edad del paciente, así como por la técnica utilizada en la preparación. La raza del paciente también puede influir, aunque aún no se dispone de suficientes datos para respaldar esta afirmación. Es necesario conocer la edad, el sexo, el estado clínico y la raza de los sujetos a la hora de determinar un intervalo de referencia.
- Si se desea expresar los resultados en forma de recuentos absolutos, se deberán realizar una fórmula leucocitaria y un recuento de leucocitos independientes en la misma muestra de sangre. No utilice la fórmula leucocitaria del informe de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte para calcular recuentos absolutos. La fórmula leucocitaria proporcionada por el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte se imprime solamente para realizar una comparación con los resultados de la fórmula leucocitaria realizada por un laboratorio independiente con fines de control de calidad y no debe sustituir a la fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente de las historias clínicas de los pacientes ni introducirse en el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte para obtener recuentos absolutos.
- Una variación en la configuración del área de selección para análisis de linfocitos manual o automática cambiará las cantidades relativas de las subpoblaciones analizadas. El software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte utiliza el tubo de BD Leucogate™ (A) para incluir al menos el 95 % de los linfocitos totales en la muestra a fin de definir el área de selección para análisis de linfocitos y exige un examen visual del área para la validación.
- Los estados de salud anómalos no siempre se reflejan en forma de porcentajes anómalos de subpoblaciones de linfocitos. Esto significa que un individuo con un estado de salud anómalo puede presentar los mismos porcentajes de linfocitos T, B o citolíticos naturales que uno sano. Los resultados de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte deben utilizarse junto con otra información obtenida de la evaluación clínica y procedimientos de diagnóstico independientes adicionales.
- Se ha informado de un sujeto normal sin reacción con CD4.[72] No obstante, esta falta de reactividad no se ha observado en estudios de más de 300 sujetos.[71]
- La información obtenida por medio de este reactivo debe combinarse con otra información y someterse a la interpretación de un profesional de diagnóstico médico cualificado para establecer la presencia o ausencia de estados de enfermedad concretos.
- La opción de software Percent Lymphocyte Conversion (Porcentaje de conversión de linfocitos) de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte presupone que todas las células distintas de linfocitos están sin teñir y se muestran en el cuadrante 3. Por tanto, los granulocitos CD16+ que aparecen en el cuadrante 1 se incluirán como linfocitos CD16+. La muestra se marca si la contaminación con granulocitos es superior al 6 %. Los granulocitos potencialmente interferentes deben minimizarse mediante su eliminación máxima posible del área de selección de linfocitos utilizando sus propiedades de dispersión de la luz. Consulte los documentos *BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte) y *BD Monoclonal Antibodies Source Book* (Manual de referencia de anticuerpos monoclonales de BD), sección 8.3 para obtener más información sobre la opción Percent Lymphocyte Conversion (Porcentaje de conversión de linfocitos).
- Las muestras con eritrocitos nucleados pueden mostrar una lisis incompleta, ya que la solución de lisado (reactivo G) podría no lisar dichos eritrocitos. Esto puede suceder también cuando se analizan muestras de sangre de pacientes que padecen determinadas alteraciones hematológicas que dificultan la lisis de

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

los eritrocitos, como mielofibrosis y esferocitosis. Los eritrocitos nucleados se contarán como residuos y, si estos superan el 10 %, el software marcará la muestra como «too many nonlymphs in gate» (demasiadas células distintas de linfocitos en el área de selección). Se recomienda rechazar los resultados de dicha muestra. Si se selecciona la opción de software Percent Lymphocyte Conversion (Porcentaje de conversión de linfocitos), el software asume que las células que no son linfocitos, como los eritrocitos nucleados o no lisados, identificadas con BD Leucogate™, no están teñidas y las resta del C3.

- El software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte comprueba la tinción inespecífica solamente en el tubo de control B. La configuración de marcadores del tubo B debe comprobarse utilizando la población negativa del tubo C. Si los marcadores parecen estar configurados incorrectamente, vuelva a definirlos utilizando la población negativa del tubo C. El operador debe examinar la impresión en busca de pruebas de tinción de anticuerpos inespecífica en los tubos posteriores (de C a F). La tinción inespecífica puede indicarse cuando hay una separación escasa entre los grupos positivo y negativo en el gráfico de puntos de fluorescencia para los tubos de C a F. La presencia de dicha tinción inespecífica puede reflejar un cambio en el reactivo o un error en la preparación de las muestras. Estas muestras deben volver a teñirse.
- El BD Simultest™ IMK-Lymphocyte no está diseñado para la discriminación de muestras por la presencia de células leucémicas, ni para utilizarse en muestras fenotípicas de pacientes con leucemia. La presencia de blastocitos podría impedir que el BD Leucogate™ defina un área de selección de análisis de linfocitos adecuada. El software marcará la muestra y no se imprimirán los resultados.
- Las muestras que contengan células leucémicas con características de volumen y dispersión similares a las de las células maduras se contarán como tales. Ejemplos de estas son la leucemia linfocítica crónica (LLC), la leucemia linfoblástica aguda (LLA) de tipo FAB-L1 y el linfoma/leucemia de células T del adulto (LLCTA).
- En el caso de las muestras de sangre completa, la exposición de las células a la solución de lisado (reactivo G) durante más de 12 minutos puede provocar una destrucción de leucocitos debido a un choque osmótico al añadir la solución de lavado (consulte el punto 4 de Tinción y fijación de las células en la sección 7, Procedimiento).
- La capacidad del citómetro de flujo para seleccionar linfocitos y eliminar plaquetas, eritrocitos, residuos, granulocitos y monocitos del área de selección de linfocitos depende de la existencia de una clara separación entre estos elementos formados y los linfocitos en una visualización de FSC frente a SSC. Para algunos pacientes, esta separación no está clara, por lo que la definición del área de selección de linfocitos será menos efectiva.
- Las características de rendimiento se han determinado con un BD FACScan™ con software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte y verificado en el BD FACStrak™. No se han establecido características de rendimiento con ningún otro instrumento.
- Los valores de recuento absoluto de las subpoblaciones de linfocitos podrían no ser comparables entre laboratorios debido a las variaciones en los métodos de determinación de recuentos de leucocitos y/o fórmulas leucocitarias.
- Tenga presente que algunos anticuerpos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte reaccionan con otros elementos formados por células distintas de linfocitos de la sangre (consulte Reactividad cruzada en Características de rendimiento, de la sección 11).
- Tenga en cuenta que los intervalos de referencia normales establecidos por BD para la proporción de linfocitos ($CD3^+CD4^+$)/($CD3^+CD8^+$) se extienden por debajo de una proporción de 1,0 (tablas 4 y 5).

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

10. VALORES ESPERADOS

Subpoblaciones de leucocitos

Los datos correspondientes a cuatro cuadrantes distintos se recogen y muestran para cada tubo en la pantalla del BD FACScan™ y el BD FACStrak™ (figura 2).

Las poblaciones celulares presentes en cada cuadrante para cada tubo se muestran en la tabla 1 y en la *BD Simultest™ IMK-Lymphocyte Software User's Guide* (Guía del usuario del software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte). Los resultados clínicamente significativos se encuentran en el informe del médico.

BD ha investigado los intervalos de referencia normales para los parámetros del BD Simultest™ IMK-Lymphocyte en 160 sujetos masculinos y femeninos normales utilizando el citómetro de flujo BD FACScan™ en tres centros (dos centros clínicos de EE. UU. y los laboratorios de BD en San José, California). Los intervalos de referencia normales esperados para LWB se muestran en la tabla 4.[72] Los intervalos se presentan en forma de porcentajes de linfocitos en el área de selección de análisis utilizando el tubo de BD Leucogate™ y la opción Percent Lymphocyte Conversion (Porcentaje de conversión de linfocitos) en el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte.

Tabla 4 Intervalos de referencia representativos[a] para los parámetros de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte en adultos normales desde el punto de vista hematológico como porcentajes de los linfocitos del área de selección totales (convertidos) (datos agrupados de tres centros clínicos)

Parámetro	Sexo	Edad	n	Media (%)	Intervalo del 95 %[b]
Linfocitos T totales	Ambos	18–70	160	72	59–85
Linfocitos B totales	Ambos	18–70	160	13	6,4–23
Linfocitos T colaboradores/inductores	Masculino	18–70	84	43	29–57
	Femenino	18–70	75	46	31–61
Linfocitos T supresores/citotóxicos	Ambos	18–70	159	25	11–38
Proporción de linfocitos T colaboradores/supresores	Ambos	18–70	159	1,9	0,9–3,6
Linfocitos citolíticos naturales	Ambos	18–70	160	14	5,6–31

a. Estos datos se recogieron en un citómetro de flujo BD FACScan™ utilizando reactivos y software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte. El software empleado fue BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, de la familia de software BD Simulset™.

b. El intervalo del 95 % se obtiene mediante el ajuste de una distribución adecuada a los datos, seguido del cálculo del área del 95 % central de la distribución ajustada.

Los intervalos obtenidos se analizaron respecto a las diferencias por centro clínico, por sexo del sujeto y por edad del sujeto. Para cada población celular, se realizaron comparaciones no paramétricas entre los valores obtenidos en cada centro de estudio, entre los valores obtenidos para hombres y mujeres, y entre los valores obtenidos para sujetos de entre 18 y 70 años de edad. Cuando la comparación indicó una diferencia significativa, los datos de los grupos no se combinaron y se ofrecen intervalos de referencia independientes. El intervalo de referencia normal para los porcentajes de células positivas se calculó por una distribución ajustada.[73] La capacidad de combinar intervalos de referencia para los parámetros de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte (tabla 4) indica la reproducibilidad entre laboratorios.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Existen diferencias pequeñas pero significativas entre los sexos para los linfocitos T colaboradores/inductores. Se presenta más de un límite superior e inferior para los intervalos de linfocitos T colaboradores/inductores (tabla 4 y 5) debido a las diferencias de sexo observadas.

No se deben utilizar los intervalos de referencia para adultos con muestras de sangre de pacientes pediátricos.

La raza puede ser una variable en la definición de los intervalos de referencia normales,[74] aunque BD no ha recopilado datos suficientes para determinarlo.

NOTA Los valores normales previstos pueden variar según la edad, el sexo o la raza del paciente. Debido a estas diferencias, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia normal para cada parámetro.

Recuentos absolutos

El sistema BD FACScan™/BD CONSORT™ 30 o 32 y el sistema BD FACStrak™/BD CONSORT™ 31 con software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte calculan automáticamente el recuento absoluto si un recuento de leucocitos y el porcentaje de linfocitos, o un recuento absoluto de linfocitos, se obtienen y se introducen en el software.

Tabla 5 Intervalos de referencia representativos[a] (recuentos absolutos de un centro clínico) para los parámetros de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte en adultos normales desde el punto de vista hematológico (18–70 años)

	Sexo	n	Media	Intervalo del 95 %[b]
WBC[c]	Ambos	63	5,66	3,50–9,40
Porcentaje de linfocitos[c]	Ambos	62	29,8	19,0–43,0
Linfocitos T totales	Ambos	62	1,20	0,72–2,33
Linfocitos B totales	Ambos	62	0,23	0,10–0,43
Linfocitos T colaboradores/inductores	Masculino	42	0,67	0,43–1,01
	Femenino	20	0,90	0,50–1,76
Linfocitos T supresores/citotóxicos	Ambos	61	0,44	0,17–1,05
Proporción de linfocitos T colaboradores/supresores	Ambos	62	1,89	0,87–3,40
Linfocitos citolíticos naturales	Ambos	62	0,29	0,09–0,43

a. Estos datos se recogieron en un citómetro de flujo BD FACScan™ utilizando reactivos y software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte. El software empleado fue BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, de la familia de software BD Simulset™. Los recuentos absolutos se expresan como 103 leucocitos/µl.

b. El intervalo del 95 % se calcula directamente a partir de los datos utilizando los percentiles 2,5 y 97,5.

c. Los datos de hematología se obtuvieron de un analizador de hematología Sysmex K1000 (Sysmex Corporation of Japan)

NOTA No utilice los valores de fórmula leucocitaria en tres partes obtenidos con BD Simultest™ IMK-Lymphocyte para determinaciones de recuentos absolutos. La fórmula leucocitaria en tres partes proporcionada por el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte debe utilizarse solamente para realizar una comparación con una fórmula leucocitaria independiente con fines de control de calidad y no debe sustituir

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 146 de 196

a una fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente en las historias clínicas de los pacientes ni introducirse en el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte para obtener recuentos absolutos.

Los recuentos absolutos presentan diferencias significativas entre laboratorios según el procedimiento utilizado para obtener los recuentos de leucocitos y la fórmula leucocitaria.

Los recuentos absolutos representativos se muestran en la tabla 5. La tabla se genera a partir de los datos adquiridos en un centro clínico de EE. UU. Los parámetros de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte se expresan como un porcentaje de linfocitos en el área de selección para análisis de linfocitos. Consulte el documento BD *Monoclonal Antibodies Source Book* (Manual de referencia de anticuerpos monoclonales de BD), sección 8.3.

11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El rendimiento del kit de reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte se estableció mediante análisis en dos centros clínicos de EE. UU. y en los laboratorios de BD en San José, California.

Reproducibilidad intramuestral

Se obtuvieron muestras de sangre de seis sujetos normales y cuatro anómalos, se dividieron en partes alícuotas (dos veces tanto para las normales como para las anómalas), se tiñeron con los reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, y se lisaron, lavaron y fijaron dentro de las 6 horas siguientes a la recogida de las muestras. Se llevó a cabo el análisis por citometría de flujo en un plazo de 24 horas en un citómetro de flujo BD FACScan™ en el mismo laboratorio. En las tablas 6 y 7 se muestra la reproducibilidad intramuestral media obtenida tanto para sujetos normales como para sujetos anómalos.

Tabla 6 Reproducibilidad intramuestral[a] para los parámetros de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte (6 sujetos normales) como porcentajes de linfocitos del área de selección (convertidos)

Parámetro	Media[b] como % de linfocitos	DE como cálculo de la reproducibilidad dentro de la tinción[c]	df[d]	DE como cálculo de la reproducibilidad entre tinciones	df[e]
Linfocitos T totales	72,7	0,845	12	0,858	15,6
Linfocitos B totales	13,5	0,816	12	0,816	18,0
Linfocitos T colaboradores/inductores	45,8	1,080	12	1,486	10,4
Linfocitos T supresores/citotóxicos	27,2	0,817	12	1,061	11,1
Proporción de linfocitos T colaboradores/supresores	1,72	0,063	12	0,071	15,0
Linfocitos citolíticos naturales	13,3	1,384	12	1,384	17,8

a. Estos datos se recogieron en un citómetro de flujo BD FACScan™ utilizando reactivos y software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte. El software empleado fue BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, de la familia de software BD Simulset™.

b. La media es la media combinada, $\bar{Y}$ = la media de las medias individuales. Las medias se expresan como porcentajes de linfocitos (excepto para la proporción de linfocitos colaboradores/supresores).

c. DE = desviación estándar, la desviación estándar combinada.

d. df (normal) = grados de libertad, el número de observaciones (4) menos el número de medias (2), multiplicado por el número de sujetos (6) = 12.

e. df = grados de libertad utilizando el método de Satterthwaite.[74]

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Tabla 7 Reproducibilidad intramuestral[a] para los parámetros de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte (4 sujetos normales) como porcentajes de linfocitos del área de selección (convertidos)

Parámetro	Media[b] como % de linfocitos	DE como cálculo de la reproducibilidad dentro de la tinción[c]	df[d]	DE como cálculo de la reproducibilidad entre tinciones	df[e]
Linfocitos T totales	82,9	0,766	8	0,927	8,1
Linfocitos B totales	8,81	0,559	8	0,662	8,4
Linfocitos T colaboradores/inductores	31,6	1,061	8	1,118	9,9
Linfocitos T supresores/citotóxicos	51,4	1,369	8	1,561	8,8
Proporción de linfocitos T colaboradores/supresores	0,69	0,031	8	0,031	11,8
Linfocitos citolíticos naturales	8,00	0,707	8	0,707	11,5

a. Estos datos se recogieron en un citómetro de flujo BD FACScan™ utilizando reactivos y software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte. El software empleado fue BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, de la familia de software BD Simulset™.

b. La media es la media combinada, $\bar{Y}$ = la media de las medias individuales. Las medias se expresan como porcentajes de linfocitos (excepto para la proporción de linfocitos colaboradores/supresores).

c. DE = desviación estándar, la desviación estándar combinada.

d. df (anómalo) = grados de libertad, el número de observaciones (4) menos el número de medias (2), multiplicado por el número de sujetos (4) = 8.

e. df = grados de libertad utilizando el método de Satterthwaite.[74]

Reproducibilidad interinstrumental

Utilizando un protocolo similar al indicado anteriormente, las muestras de sangre completa de cinco sujetos normales se dividieron en dos partes alícuotas, se tiñeron con los reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, y se lisaron, lavaron y fijaron. Cada una de las muestras se analizó dos veces en dos citómetros de flujo BD FACScan™ diferentes. Los resultados se presentan en la tabla 8.

Tabla 8 Reproducibilidad interinstrumental[a] para los parámetros* de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte (5 sujetos normales y 2 instrumentos) como porcentajes de linfocitos del área de selección (convertidos)

Parámetro de IMK-Lymphocyte	Instrumento	Media (%)[b]	DE[c]	CV[d]
Linfocitos T totales	1	68,2	0,77	1,13
	2	68,7	0,71	1,04
Linfocitos B totales	1	17,2	0,80	4,66
	2	17,8	0,88	4,97
Linfocitos T colaboradores/inductores	1	38,6	1,04	2,68
	2	38,1	0,88	2,32

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 12345
Gerente Técnico
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Parámetro de IMK-Lymphocyte	Instrumento	Media (%)[b]	DE[c]	CV[d]
Linfocitos T supresores/citotóxicos	1	28,9	1,04	3,58
	2	27,6	1,00	3,62
Proporción de linfocitos T colaboradores/supresores	1	1,51	0,06	3,74
	2	1,54	0,07	4,47
Linfocitos citolíticos naturales	1	12,9	0,46	3,58
	2	13,4	0,41	3,06

a. Estos datos se recogieron en un citómetro de flujo BD FACScan™ utilizando reactivos y software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte. El software empleado fue BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, de la familia de software BD Simulset™.

b. La media es la media combinada, $\bar{Y}$ = la media de las medias individuales. Las medias se expresan como porcentajes de linfocitos (excepto para la proporción de linfocitos colaboradores/supresores).

c. DE = desviación estándar, la desviación estándar combinada.

$$DE = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + \ldots + (n_k - 1)s_k^2}{n_1 + n_2 + \ldots + n_k - k}}$$

s_i^2 = variación de la muestra i para $1 \leq i \leq k$.

k = número de muestras.

n = número de observaciones en una muestra.

d. CV = coeficiente de variación medio (= DE/Y × 100).

Reproducibilidad entre laboratorios

La reproducibilidad entre laboratorios se indica mediante la capacidad para agrupar los intervalos de referencia normales para los parámetros de BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, tal como se muestra en la tabla 4.

BD Simultest™ IMK-Lymphocyte frente al método comparativo

Las partes alícuotas de las mismas muestras de sangre, tanto de sujetos normales como anómalos, utilizadas para determinar los intervalos de referencia normales se analizaron con los reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte (utilizando el software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte) y los reactivos BD Simultest™ IMK Plus (utilizando el software BD Simultest™ IMK Plus).

Las muestras se tiñeron, lisaron, lavaron y fijaron, y el análisis mediante citometría de flujo se realizó utilizando el BD FACScan™. Los resultados se compararon mediante una regresión lineal. En la tabla 9 se presenta un resumen de los resultados.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Tabla 9 BD Simultest™ IMK-Lymphocyte frente al método comparativo[a] (panel de reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte y panel de reactivos BD Simultest™ IMK Plus)[b]

Parámetro	Pendiente	Intersección	r	n	Intervalo de datos (%)	
					IMK Plus	IMK-Lymphocyte
Linfocitos T totales	0,94	3,66	0,96	85	50–97	47–96
Linfocitos B totales	0,98	0,62	0,97	85	1–25	1–29
Linfocitos T colaboradores/inductores	0,95	–0,27	0,96	84	8–68[c]	8–65
Linfocitos T supresores/citotóxicos	1,01	–6,03	0,93	84	19–74[d]	12–67
Proporción de linfocitos T colaboradores/supresores	1,25	–0,08	0,90	84	0,17–3,0[e]	0,21–3,17
Linfocitos citolíticos naturales	0,96	0,37	0,96	85	2–32	1–33

a. Estos datos se recogieron en un citómetro de flujo BD FACScan™ utilizando reactivos y software BD Simultest™ IMK-Lymphocyte. El software empleado fue BD Simultest™ IMK-Lymphocyte, de la familia de software BD Simulset™.

b. Los dos métodos difieren en que el kit BD Simultest™ IMK Plus utiliza el reactivo CD4/CD8 para identificar linfocitos T colaboradores/inductores y supresores/citotóxicos, mientras que BD Simultest™ IMK-Lymphocyte utiliza los reactivos CD3/CD4 y CD3/CD8 para distinguir las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores/inductores reales y supresores/citotóxicos reales.

c. Incluye los monocitos.

d. Incluye linfocitos citolíticos naturales.

e. Incluye los monocitos y los linfocitos citolíticos naturales.

Estabilidad de las preparaciones celulares teñidas

Las preparaciones celulares de seis sujetos normales y cuatro anómalos se adquirieron y analizaron en el BD FACScan™. Las preparaciones se conservaron a una temperatura de 2–8 °C en un lugar oscuro durante 24 horas, y se repitió el análisis mediante citometría de flujo. Los resultados demuestran diferencias pequeñas pero estadísticamente significativas para los valores de linfocitos T colaboradores/supresores y para los valores de proporción de linfocitos T colaboradores/supresores entre el día 0 y el día 1. Todas las demás diferencias no fueron significativas. Se recomienda analizar las muestras en las 24 horas siguientes a la tinción.

Reactividad cruzada

La especificidad de estos anticuerpos monoclonales ha sido establecida mediante análisis ciego en diversos laboratorios por el International Leucocyte Workshop Group.[29,31,38,42,61,62]

Se ha informado de que el anticuerpo CD45 reacciona débilmente frente a los eritrocitos circulantes maduros y plaquetas.[12,34] El anticuerpo CD14 reacciona frente a los granulocitos,[37] así como monocitos/macrófagos. El anticuerpo CD4 reacciona frente a los monocitos, así como los linfocitos T colaboradores/inductores.[51] El antígeno CD8 está presente en una subpoblación de linfocitos citolíticos naturales.[26] El anticuerpo CD16 reacciona débilmente frente a los neutrófilos.[61] Los granulocitos potencialmente interferentes deben eliminarse del área de selección de linfocitos utilizando sus propiedades de dispersión de la luz.

Aunque el reactivo de control (reactivo B) está diseñado para detectar tinción inespecífica, puede observarse tinción inespecífica debido al mal estado de las células con cualquier reactivo de anticuerpo. Puede deducirse la existencia de tinción inespecífica si no se observa una separación clara entre las células

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 150 de 196

negativas y las positivas en el gráfico de fluorescencia o si más del 5 % de los eventos del tubo de control aparecen fuera del C3. Consulte la sección Solución de problemas al final de estas instrucciones de uso si observa tinción inespecífica.

Linealidad-recuperación

Todos los lotes de reactivos BD Simultest™ IMK-Lymphocyte se analizan en suspensiones celulares para garantizar un rendimiento óptimo con 100 µl de sangre completa. Para este estudio, el rango normal fue de $3,5\times10^3$–$9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl. Se espera que los resultados sean lineales de $3,5 \times 10^3$–$9,4 \times 10^3$ leucocitos/µl.

12. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posibles causas	Solución
La separación entre poblaciones negativas y positivas es insuficiente.	Reducción de la fluorescencia debido a un voltaje de PMT o a una ganancia del amplificador incorrectos.	Ejecutar el software AutoComp™ con BD Calibrite™ Beads. Deben cumplirse las especificaciones de intensidad en los canales de fluorescencia.
	Reactivo de anticuerpo insuficiente.	Comprobar la calibración de la pipeta, el volumen de reactivo añadido, y el volumen y la concentración de las células añadidas. Comprobar las condiciones de almacenamiento del reactivo.
Ausencia de separación entre los residuos y los grupos de linfocitos en el gráfico de puntos de dispersión de la luz.	Presencia de exceso de plaquetas o de eritrocitos nucleados o no lisados.	Volver a teñir una muestra nueva. Lavar las células a una velocidad más baja, como 100 *g*, durante 15 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).
	Ganancia del amplificador de FSC mal ajustada.	Ajustar la ganancia del amplificador de FSC de forma que el borde izquierdo del grupo de linfocitos comience aproximadamente en el canal 50 (escala de 256 canales). Esto es especialmente importante al ir de la configuración/compensación con el software AutoComp™ a las determinaciones de sangre completa. Consultar la guía del usuario o el manual del instrumento correspondiente.
	Muestra no teñida en las 6 horas siguientes a la recogida.	Recoger una muestra nueva para teñir.
	Umbral de FSC ajustado en un nivel demasiado alto o demasiado bajo.	Ajustar el umbral de FSC de forma que haya aproximadamente 10 canales de residuos (escala de 256 canales).

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Problema	Posibles causas	Solución
Rendimiento de la tinción de anticuerpos inferior al óptimo.	Muestra no teñida en las 6 horas siguientes a la recogida.	Recoger una muestra nueva para teñir.
	El área de selección de análisis seleccionada por el software incluía demasiados eventos que no son linfocitos.	Volver a procesar los datos con el software BD CONSORT™ 30, BD LYSYS™ II o BD Simulset™ y definir un área de selección manual. **Nota:** Un área de selección de linfocitos reducida podría dejar fuera a los linfocitos grandes (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales y linfoblastos). Si es posible, volver a adquirir las muestras una vez optimizada la dispersión, ajustar los parámetros PMT de SSC, ganancia de amplificador de FSC y umbral de FSC para separar los grupos de linfocitos de los residuos. Consulte la guía del usuario del software correspondiente.
	Marcadores de fluorescencia mal definidos.	Volver a procesar los datos con el software BD CONSORT™ 30, BD LYSYS™ II o BD Simulset™ y definir marcadores de fluorescencia manuales.
El software no puede definir un área de selección de linfocitos aceptable.	La muestra es linfopénica.	Concentrar las células mediante un método de gradiente de densidad o volver a adquirir una cantidad de eventos mayor con BD CONSORT™ 30 o BD LYSYS™ II.
	Umbral de FSC ajustado en un nivel demasiado alto o demasiado bajo.	Ajustar el umbral de FSC de forma que haya aproximadamente 10 canales de residuos (escala de 256 canales).
	Ganancia del amplificador de FSC y/o SSC mal ajustada.	Ajustar la ganancia del amplificador de FSC de forma que el borde izquierdo del grupo de linfocitos comience aproximadamente en el canal 50 (escala de 256 canales). Ajustar la ganancia del amplificador de SSC para optimizar las poblaciones celulares. Esto es especialmente importante al ir de la configuración/compensación con el software AutoComp™ a las determinaciones de sangre completa. Consulte la guía del usuario correspondiente.
	Muestra no teñida en las 6 horas siguientes a la recogida.	Recoger una muestra nueva para teñir.
	Ajuste del marcador del software inadecuado.	Volver a adquirir los datos con el software BD CONSORT™ 30 o BD LYSYS™ II.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Problema	Posibles causas	Solución
Células no teñidas de la muestra teñida traspasan el marcador definido con el tubo de control (B) hacia C4 o C1.	Tinción inespecífica debido a que la muestra contiene células muertas o dañadas.	Recoger una muestra nueva para teñir.
	Tinción inespecifica debido a receptores Fc.	Comprobar si hay una excesiva contaminación de monocitos, granulocitos o residuos en el área de selección de análisis de linfocitos.
Tinción débil o irregular.	Concentración celular excesiva en la etapa de tinción.	Comprobar y ajustar la concentración celular; repetir la tinción con una muestra nueva.
	Reactivo insuficiente.	Repetir la tinción con la cantidad de reactivo adecuada.
	Células no analizadas en las 24 horas siguientes a la tinción.	Repetir la tinción con una muestra nueva; analizar rápidamente.
	Preparación incorrecta del medio (se ha omitido la azida sódica).	Usar azida sódica en el medio de tinción y en las etapas de lavado.
	Tampón o solución fijadora con pH inadecuado.	Preparar una PBS recién diluida con agua grado reactivo y una solución fijadora nueva con PBS que contenga azida sódica. Ajustarla en el pH apropiado. Filtrar a través de un filtro de 0,2 µm.
	Posible contaminación de la PBS o la solución fijadora.	

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

Problema	Posibles causas	Solución
Pocas células o ninguna.	Concentración celular demasiado baja.	Volver a poner en suspensión una muestra nueva a una concentración más alta. Repetir la tinción y el análisis.
	Velocidad de centrífuga demasiado baja.	Comprobar la calibración de la centrífuga. Repetir la preparación a la velocidad de centrífuga correcta.
	Funcionamiento incorrecto del citómetro de flujo.	Seguir las instrucciones para la solución de problemas del instrumento.
Aumento de la autofluorescencia.	Posible contaminación de la PBS o la solución fijadora.	Preparar una PBS recién diluida con agua de grado reactivo y una solución fijadora nueva; filtrar la PBS y la solución fijadora a través de un filtro de 0,2 µm.
	Preparación de muestra insuficiente.	Recoger una muestra nueva y teñirla.

GARANTÍA

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

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

REFERENCIAS

1. Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T, et al. A definition of natural killer cells. In: Ades EW, Lopez C, eds. *Natural Killer Cells and Host Defense.* Basel: Karger; 1989:1.
2. Brain P, Gordon J, Willets W. Rosette formation by peripheral lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1970;6:681-688.
3. Jondal M, Holm G, Wigzell H. Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J Exp Med.* 1972;136:207-215.
4. Wolde-Mariam W, Peter J. Recent diagnostic advances in cellular immunology. *Diagnost Med.* 1984;7:25-32.
5. Fröland S, Natvig JB, Berdal P. Surface-bound immunoglobulin as a marker of B lymphocytes in man. *Nat New Biol.* 1971;234:251-252.
6. Bellanti J, Peters S. Diagnostic applications of immunology. In: Bellanti J, ed. *Immunology III.* Philadelphia: WB Saunders Co; 1985:558-569.
7. Winchester RJ, Fu SM, Hoffman T, Kunkel HG. IgG on lymphocyte surfaces: technical problems and the significance of a third cell population. *J Immunol.* 1975;114:1210-1212.
8. Wofsy L, Henry C, Kimura J, North J. Modification and use of antibodies to label cell surface antigens. In: Mishell B, Shiigi S, eds. *Selected Methods in Cellular Immunology.* San Francisco: WH Freeman and Co; 1980:287-304.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

9. Henry C, Mishell B, Shiigi S. Hemolytic plaque assays. In: Mishell B, Shiigi S, eds. *Selected Methods in Cellular Immunology*. San Francisco: WH Freeman and Co; 1980:69-123.
10. Grabstein K, Chen Y. Cell-mediated cytolytic responses. In: Mishell B, Shiigi S, eds. *Selected Methods in Cellular Immunology*. San Francisco: WH Freeman and Co; 1980:124-137.
11. Oi V, Herzenberg L. Immunoglobulin-producing hybrid cell lines. In: Mishell B, Shiigi S, eds. *Selected Methods in Cellular Immunology*. San Francisco: WH Freeman and Co; 1980:351-372.
12. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newslett*. 1990;10:43-55.
13. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
14. Nicholson JKA, Jones BM. Immunophenotyping by flow cytometry: its use in HIV infection. *Labmedica*. 1989;6:21-26.
15. Kidd PG, Vogt RF, Jr. Report of the workshop on the evaluation of T-cell subsets during HIV infection and AIDS. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989;52:3-9.
16. Landay AL, Muirhead KA. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopath*. 1989;52:48-60.
17. Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut*. 1989;59:200-206.
18. Nicholson JK. Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immunodeficiency diseases. *Arch Pathol Lab Med*. 1989;113:598-605.
19. Foucar K, Goeken JA. Clinical application of immunologic techniques to the diagnosis of lymphoproliferative and immunodeficiency disorders. *Lab Med*. 1982;13:403-413.
20. Cohen SB, Weetman AP. Activated interstitial and intraepithelial thyroid lymphocytes in autoimmune thyroid disease. Acta Endocrinol *(Copenh.)*. 1988;119:161-166.
21. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus. Correlation with clinical features. *Am J Med*. 1982;72:783-790.
22. Giorgi JV, Hultin LE. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clinical Immunology Newsletter*. 1990;10:55-61.
23. Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Defective suppressor cell function mediated by T8+ cell lines from patients with progressive multiple sclerosis. *J Immunol*. 1986;137:3436-3439.
24. Gratama J, Naipal A, Oljans P, et al. T lymphocyte repopulation and differentiation after bone marrow transplantation. Early shifts in the ratio between T4+ and T8+ T lymphocytes correlate with the occurrence of acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1984;63:1416-1423.
25. Bishop G, Hall B, Duggin G, Horvath J, Sheil A, Tiller D. Immunopathology of renal allograft rejection analyzed with monoclonal antibodies to mononuclear cell markers. *Kidney Internat*. 1986;29:708-717.
26. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol*. 1983;131:1789-1796.
27. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS*. 1990;4:479-497.
28. Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
29. Beverley P. Production and use of monoclonal antibodies in transplantation immunology. In: Touraine J, Trager J, Betuel H, eds. *Transplantation and Clinical Immunology XI*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1980:87-94.
30. Rowe D, Beverley P. Characterisation of breast cancer infiltrates using monoclonal antibodies to human leucocyte antigens. *Br J Cancer*. 1984;49:149-159.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

31. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories: T2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leucocyte Typing.* New York, NY: Springer-Verlag; 1984:25-60.
32. Dimitriu-Bona A, Burmester GR, Waters SJ, Winchester RJ. Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1983;130:145-152.
33. Herrmann F, Komischke B, Odenwald E, Ludwig WD. Use of monoclonal antibodies as a diagnostic tool in human leukemia. I. Acute myeloid leukemia and acute phase of chronic myeloid leukemia. *Blut.* 1983;47:157-163.
34. Schwinzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
35. Goyert S, Tesio L, Ashman L, et al. Report on the CD14 Cluster Workshop. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:789-794.
36. Bernstein ID, Self S. Joint report of the myeloid section of the Second International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human Myeloid and Hematopoietic Cells.* Vol 3. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:1-25.
37. Jayaram Y, Hogg N. Surface expression of CD14 molecules on human neutrophils. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:796-797.
38. Haynes BF. Summary of T cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes.* New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:3-30.
39. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and T-cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med.* 1981;153:310-323.
40. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti–Leu-4 antibody. *J Immunol.* 1983;131:536-539.
41. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes.* Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:259-288.
42. Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: Summary and Comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes.* Vol 2. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;3-43.
43. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood.* 1988;71:603-612.
44. Brenner MB, Groh V, Porcelli SA, et al. Structure and distribution of the human γ/δ T-cell receptor. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:1049-1053.
45. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol.* 1988;6:629-662.
46. Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD19. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:34-36.
47. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD, et al. Thymus-dependent membrane antigens in man: inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to T_{H2} antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78:544-548.

ARTEAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

48. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell.* 1986;47:333-348.
49. Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 1984;312:763-767.
50. Kurrle R. Cluster report: CD3. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:290-293.
51. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Anti–Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol.* 1983;131:212-216.
52. Anderson P, Blue M-L, Morimoto C, Schlossman SF. Cross-linking of T3 (CD3) with T4 (CD4) enhances the proliferation of resting T lymphocytes. *J Immunol.* 1987;139:678-682.
53. Eichmann K, Jönsson J-I, Falk I, Emmrich F. Effective activation of resting mouse T lymphocytes by cross-linking submitogenic concentrations of the T cell antigen receptor with either Lyt-2 or L3T4. *Eur J Immunol.* 1987;17:643-650.
54. Gallagher PF, Fazekas de St. Groth B, Miller JFAP. CD4 and CD8 molecules can physically associate with the same T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 1989;86:10044-10048.
55. Rudd CE, Burgess KE, Barber EK, Schlossman SF. Monoclonal antibodies to the CD4 and CD8 antigens precipitate variable amounts of CD4/CD8-associated $p56^{lck}$ activity. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:326-327.
56. Terry LA, Disanto JP, Small TN, Flomenberg N. Differential expression of the CD8 and Lyt-3 antigens on a subset of human T-cell receptor g/d-bearing lymphocytes. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:345-346.
57. Moebius U. Cluster report: CD8. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
58. Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J Immunol.* 1983;130:2133-2141.
59. Perussia B, Acuto O, Terhorst C, et al. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J Immunol.* 1983;130:2142-2148.
60. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A, et al. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1984;133:180-189.
61. Schmidt RE. Non-lineage/natural killer section report: new and previously defined clusters. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:517-542.
62. Schubert J, Lanier LL, Schmidt RE. Cluster report: CD56. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.M
63. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of the Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med.* 1989;169:2233-2238.
64. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol.* 1991;146:4421-4426.
65. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1986;136:4480-4486.
66. Phillips J, Lanier L. Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytolysis. *J Exp Med*. 1986;164:814-825.

ESTEBAN ZORZOLI
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

67. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
68. Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html. Accessed March 12, 2019.
69. *Collection of Diagnostic Venous Blood Specimens: Approved Standard—Seventh Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. CLSI document GP41-Ed7.
70. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry—Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
71. Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
72. Angadi CV. Lack of Leu-3a epitope on T-helper (CD4) lymphocytes. *J Clin Lab Anal*. 1990;4:193-195.
73. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath*. 1991;60:190-208.
74. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol*. 1985;3:33-37.

PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

Para conocer las patentes de EE. UU. que pueden aplicarse, consulte bd.com/patents.

BD, el logotipo de BD, BD CONSORT, BD FACSComp, BD FACSFlow, BD FACStrak, BD LYSYS, BD Simulset, Calibrite, FACScan, Leucogate, Simultest y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company o de sus empresas afiliadas. Las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios. © 2023 BD. Todos los derechos reservados.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

Glosario de símbolos

Remítase al etiquetado del producto para consultar los símbolos aplicables.

Símbolo	Significado
	Fabricante
EC REP	Representante autorizado en la Unión Europea
CH REP	Representante autorizado en Suiza
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
SN	Número de serie
STERILE	Estéril
STERILE A	Esterilizado utilizando técnicas de procesado asépticas
STERILE EO	Esterilizado utilizando óxido de etileno
STERILE R	Esterilizado utilizando radiación
STERILE	Esterilizado utilizando vapor de agua o calor seco
	No volver a esterilizar
	No estéril
	No utilizar si el envase está dañado y consúltense las *instrucciones de uso*
	Vía fluida estéril
	Vía fluida estéril (óxido de etileno)
	Vía fluida estéril (irradiación)
	Frágil, manejar con cuidado
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Manténgase seco
	Límite inferior de temperatura
	Límite superior de temperatura
	Límite de temperatura
	Limitación de humedad
	Riesgos biológicos
	No reutilizar
	Consúltense las *instrucciones de uso* o consúltense las *instrucciones de uso* electrónicas
	Precaución
LATEX	Contenido o presencia de látex de caucho natural
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
CONTROL -	Control negativo
CONTROL +	Control positivo
Σ	Contenido suficiente para <*n*> pruebas
	Sólo para la evaluación del funcionamiento en diagnóstico in vitro
	Apirógeno
#	Número de paciente
	Este lado hacia arriba
	No apilar

Símbolo	Significado
	Sistema de barrera estéril única
PHT DEHP BBP	Contenido o presencia de ftalato: combinación de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y butilbenciftalato (BBP)
	Recoger por separado Indica la recogida por separado obligatoria de los residuos de aparatos eléctricos y electrónicos.
CE	Marcado CE; significa que cumple con la especificación técnica europea
	Prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente
	Producto para autodiagnóstico
Rx Only	Esto solo se aplica a EE. UU.: «Precaución: La ley federal estadounidense impone restricciones sobre este dispositivo, cuya venta debe ser realizada por un médico o por orden de este».
CC	País de fabricación «CC» debe sustituirse por el código de país de dos o tres letras.
	Hora de recogida
	Cortar
	Despegar por aquí
	Fecha de recogida
	Manténgase fuera de la luz
	Se produce gas de hidrógeno
	Perforación
	Número de secuencia del panel de inicio
	Número de secuencia del panel final
	Número de secuencia interno
/	<n.º de envase>/<total de envases>
MD	Producto sanitario
	Contiene sustancias peligrosas
	Marca de conformidad ucraniana
	Cumple los requisitos de la FCC conforme a 21 CFR, parte 15
c UL us	Certificación de producto UL para EE. UU. y Canadá
UDI	Identificador único de dispositivo
	Importador
	Colocar la etiqueta del paciente únicamente en el área enmarcada
MR	Compatible con la resonancia magnética (RM)
MR	Compatibilidad condicional con la resonancia magnética (RM)
MR	Incompatible con la resonancia magnética (RM)
For use with	Para uso con
This Product Contains Dry Natural Rubber	Este producto contiene goma natural seca
For Export Only	Solo para exportación
Instruments	Instrumentos

Nota: La disposición del texto en los símbolos viene determinada por el diseño de la etiqueta.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15843
Co-Director Técnico - Apoderado

L006715(08) 2023-03

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
155 North McCarthy Boulevard
Milpitas, California 95035 USA

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Road
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Limited
14B George Bourke Drive
Mt. Wellington Auckland 1060
New Zealand

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite bdbiosciences.com.

ClinicalApplications@bd.com

eifu.bd.com

HISTORIAL

Revisión	Fecha	Cambios realizados
23-23279(02)	2023-08	Se ha actualizado la dirección legal del fabricante. Se ha actualizado el glosario de símbolos. Se ha añadido la sección «Historial». Se ha actualizado la sección «Patentes y marcas comerciales». Se han eliminado las referencias de CellWASH. Se ha actualizado la tabla de la sección «Precauciones».

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 160 de 196

BD Simultest™ IMK Plus

N.º de catálogo 349217

23-23280(02)
2023-08
Español

℞ Only IVD

1. USO PREVISTO

El kit de reactivos BD Simultest™ IMK Plus es un método de inmunofluorescencia directa de dos colores que se utiliza para enumerar porcentajes de las siguientes subpoblaciones de linfocitos humanos maduros (no blastocitos) en sangre completa con eritrocitos lisados (LWB): linfocitos T ($CD3^+$) y T activados ($CD3^+$ $HLA\text{-}DR^+$), linfocitos B ($CD19^+$), linfocitos colaboradores/inductores ($CD4^+$) y supresores/citotóxicos ($CD8^+$) y linfocitos citolíticos naturales (NK) ($CD16^+$ o $CD56^+$ o ambos). También permite determinar la proporción de linfocitos colaboradores/supresores ($CD4^+/CD8^+$).

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los linfocitos humanos pueden dividirse en tres grandes subpoblaciones según su función biológica y la expresión del antígeno de superficie celular que corresponde a la función: linfocitos-T, linfocitos B y linfocitos citolíticos naturales (NK). Los linfocitos T participan en la inmunidad mediada por células específicas del antígeno y regulan la secreción de inmunoglobulina por los linfocitos B. Los linfocitos T se pueden clasificar también según sus propiedades funcionales como colaboradores/inductores, supresores/citotóxicos o activados.

Los métodos históricos de ensayo de subpoblaciones de linfocitos eran problemáticos porque dependían de la técnica, requerían mucho tiempo o no eran muy específicos de la estirpe celular. Entre los métodos clásicos se incluían la identificación de linfocitos T mediante la formación de rosetas con eritrocitos de sangre de oveja (SRBC)[1] y la identificación de linfocitos B mediante el uso de SRBC recubiertos con anticuerpos policlonales marcados con fluorocromo específicos de inmunoglobulina superficial.[1] Los ensayos con linfocitos citolíticos incluían el ensayo en placa hemolítica[2] y un ensayo de citotoxicidad para detectar la liberación de cromo radiactivo.[3]

Se han utilizado reactivos de anticuerpos para distinguir los antígenos de superficie celular mediante microscopia de fluorescencia, microscopia electrónica y ensayo con marca radiactiva.[4] Los métodos de microscopia no son muy sensibles debido al número limitado de células que se pueden analizar, mientras que los métodos que emplean isótopos radiactivos exigen consideraciones de seguridad y eliminación de residuos adicionales. La citometría de flujo con inmunofluorescencia indirecta, al tiempo que proporciona sensibilidad de ensayo,[5] exige un paso adicional para añadir el reactivo secundario marcado con fluorocromo.

Los linfocitos de sangre completa humana tradicionalmente se preparaban para el análisis mediante citometría de flujo utilizando métodos de separación en gradientes de densidad. Diversos estudios han demostrado que estos métodos requerían mucho tiempo, implicaban varios pasos de manipulación de la sangre y podían provocar la pérdida de subpoblaciones de linfocitos.[5-8] El método LWB utilizado con este kit no requiere separación en gradientes de densidad y, por tanto, permite un tiempo de preparación de las

ESTEBAN ZORZOLI

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

muestras más corto y menor manipulación de la sangre completa[6] (consulte el documento *BD Monoclonal Antibodies Source Book,* [Manual de referencia de anticuerpos monoclonales de BD], sección 2.2).

El desarrollo de anticuerpos monoclonales y de la tecnología de citometría de flujo ha posibilitado nuevas formas de identificación de subpoblaciones de leucocitos y de monitorización inmunológica. Los anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo y la citometría de flujo multicolor permiten la cuantificación simultánea de dos o más subpoblaciones de leucocitos. La monitorización inmunológica se facilita mediante citómetros de flujo, como el sistema BD FACScan™, que caracteriza con exactitud las células por medio del análisis de cuatro parámetros. El sistema BD FACScan™, cuando se utiliza con el software BD Simultest™ IMK Plus, caracteriza hasta 50 000 células en una sola muestra mediante el análisis simultáneo de la dispersión frontal (FSC), la dispersión lateral (SSC) y la fluorescencia multicolor.

Aplicaciones clínicas

NOTA No en todos los estudios citados en esta sección se han empleado reactivos de BD.

Los porcentajes totales de linfocitos T y B se utilizan para caracterizar algunas formas de enfermedades de inmunodeficiencia[9,10] y algunos tipos de enfermedades autoinmunitarias.[1112]

Los linfocitos T activados (linfocitos T HLA-DR$^+$) pueden ser elevados en estados de activación inmunitaria,[13] que podría estar causada por una infección,[14] o de un rechazo inminente en el caso de monitorización de trasplantes.[15] La causa real de la activación inmunitaria debe comprobarse mediante la realización de análisis clínicos y de laboratorio adicionales.

Los linfocitos colaboradores/inductores son una subpoblación de linfocitos T (CD3$^+$) que también expresan el antígeno CD4. Los linfocitos supresores/citotóxicos expresan el antígeno CD8 y son principalmente una subpoblación de linfocitos T (CD3$^+$), aunque una subpoblación de linfocitos citolíticos naturales también es positiva para CD8$^+$[16]. La determinación de los porcentajes de linfocitos CD4$^+$ y CD8$^+$ puede ser útil para controlar el estado inmunológico de pacientes con enfermedades de inmunodeficiencia, enfermedades autoinmunitarias o reacciones inmunitarias. El porcentaje relativo de la subpoblación de CD4$^+$ es reducido y el porcentaje relativo de la subpoblación de CD8$^+$ es elevado en un gran número de pacientes con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas,[9] como la inmunodeficiencia combinada grave (IDCG)[9] y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).[17]

El porcentaje de células supresoras/citotóxicas puede estar fuera del intervalo de referencia normal en algunas enfermedades autoinmunitarias[11] y en determinadas reacciones inmunitarias, como la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) aguda[18] y los rechazos de trasplantes.[15] El porcentaje relativo de la población de linfocitos CD8$^+$ con frecuencia puede disminuir en el lupus eritematoso sistémico (LES) activo, pero también puede aumentar en pacientes con LES sometidos a terapia con esteroides.[1]

La proporción de linfocitos CD4$^+$/CD8$^+$ (colaboradores/supresores), cuantificada como la proporción de linfocitos CD4 positivos para FITC frente a los linfocitos CD8 positivos para PE, se ha utilizado para evaluar el estado inmunológico de pacientes con un diagnóstico o sospecha de desarrollo de enfermedades autoinmunitarias[11,12] o inmunodeficiencias.[1,17] En muchos casos, los porcentajes relativos de linfocitos colaboradores se reducen y los linfocitos supresores aumentan en estados de inmunodeficiencia. Estos estados también pueden estar marcados por una linfopenia de células T.[1019] Además, la proporción se ha utilizado para controlar la aparición de EICH aguda en pacientes sometidos a un trasplante de médula ósea.[18] Aunque se trata de un indicador útil, el uso de la proporción de linfocitos CD4$^+$/CD8$^+$ (colaboradores/supresores) tiene limitaciones específicas que se comentan en la sección 9, Limitaciones, de estas instrucciones de uso.

Los linfocitos citolíticos naturales, identificados como negativos para CD3 y positivos para CD16 o CD56, o ambos,[20] han demostrado actuar como mediadores de citotoxicidad contra determinados tumores y células

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

diana infectadas con virus. La citotoxicidad mediada por linfocitos NK no requiere que haya moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (CHP) de clase I o clase II presentes en la célula diana.[21] La actividad de los linfocitos citolíticos naturales es reducida en los pacientes con SIDA y, en algunos casos, en el complejo y el síndrome de linfadenopatía relacionados con el SIDA.[22]

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El kit contiene seis pares de reactivos de anticuerpos monoclonales murinos BD Simultest™ conjugados con FITC y PE que incluyen BD Leucogate™ (CD45/CD14) (reactivo A) para el establecimiento de un área de adquisición de linfocitos y BD Simultest™ Control IgG_1 FITC/IgG_{2a} PE (reactivo B) para la definición de los marcadores de fluorescencia alrededor de la población negativa y la detección de unión de anticuerpos inespecífica de antígenos. El kit contiene también BD Simultest™ IMK Plus Lysing Solution (Reactivo G) para la preparación de células mediante el método LWB. Se recomienda utilizar el sistema BD FACScan™ para la citometría de flujo y el software BD Simultest™ IMK Plus para la evaluación de los datos.

Se recoge una muestra de sangre periférica nueva por venopunción y se tiñe en las 6 horas siguientes con cada uno de los seis reactivos de anticuerpos del kit BD Simultest™ IMK Plus. Cuando se añaden los reactivos de anticuerpos monoclonales a sangre humana completa, los anticuerpos marcados con fluorocromo se unen específicamente a los antígenos de la superficie de los leucocitos. Las muestras teñidas se tratan después con BD Simultest™ IMK Plus Lysing Solution para lisar los eritrocitos, y se lavan antes del análisis por citometría de flujo.

Una muestra parcial (alícuota) del paciente teñida se introduce en el citómetro de flujo y pasa en una estrecha corriente a través del trayecto de un haz de láser. Las células teñidas emiten fluorescencia cuando las excita el haz del láser, y la luz emitida se recoge y procesa mediante el citómetro de flujo. El uso de dos fluorocromos permite un análisis bicolor simultáneo, puesto que cada fluorocromo emite luz a una longitud de onda diferente cuando es excitado a 488 nm por un láser de iones de argón. Los linfocitos teñidos con FITC emiten luz de color amarillo verdoso (emisión máxima aproximada de 515 nm), mientras que los linfocitos teñidos con PE emiten luz de color rojo anaranjado (emisión máxima aproximada de 580 nm).

Las células interactúan también con el haz del láser dispersando la luz. La luz de dispersión frontal da una medida que coincide bastante con el tamaño de las células, mientras que la luz de dispersión lateral es una indicación de la granularidad celular. El citómetro de flujo BD FACScan™ utilizado con el software BD Simultest™ IMK Plus cuenta un número de células suficiente para garantizar que en el área de adquisición se incluyan un mínimo de 2000 linfocitos. Los archivos de datos deben guardarse en modo de lista y se les deben asignar nombres lógicos que ayuden a recuperar dichos datos para realizar análisis posteriores con el software BD Simultest™ IMK Plus.

El software BD Simultest™ IMK Plus utiliza BD Leucogate™, reactivo A, para establecer un área de adquisición de linfocitos que incluya un porcentaje igual o superior al 98 % de los linfocitos (no blastocitos) maduros normales de la muestra. No obstante, si el área de selección contiene un porcentaje de monocitos superior o igual al 3 %, el software reduce o restringe automáticamente el área de selección de dispersión de la luz para recoger un porcentaje superior o igual al 95 % de los linfocitos incluidos en la muestra.

El software identifica y calcula los porcentajes de monocitos, granulocitos y residuos contaminantes que están incluidos en el área de adquisición de linfocitos de BD Leucogate™ basándose en las propiedades de SSC, FSC y fluorescencia. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK Plus) para obtener información detallada sobre cómo el software define las áreas de selección y ajusta automáticamente los porcentajes de subpoblaciones mediante el uso de la pureza porcentual de la población de linfocitos del área de selección.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

La presencia de blastocitos puede afectar al procedimiento de definición de áreas de selección y provocar un fallo de procesamiento. Por tanto, las muestras que contienen blastocitos pueden hacer necesario un análisis mediante otros métodos. Si el software no puede definir un área de selección, se mostrará un mensaje en la copia impresa. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK Plus) para ver un listado completo de mensajes de error del software.

El software utiliza el control negativo, reactivo B, para definir los marcadores de fluorescencia 1 (FL1) y fluorescencia 2 (FL2) en torno a la población de linfocitos negativos, así como para evaluar el grado de unión de anticuerpos inespecífica de antígenos presente, especialmente aquella causada por receptores Fc. Cuando más del 5 % de los eventos de control se encuentre por encima de los marcadores de control negativo de FL1 o FL2, se mostrará un mensaje de error «too much nonspecific staining» (demasiada tinción inespecífica) en la pantalla del ordenador y en la impresión del laboratorio para el tubo de control B. Durante el procesamiento del tubo de control negativo por parte del software, el operador debe comprobar si aparecen mensajes de error que indiquen la unión de anticuerpos inespecífica de antígenos.

El control negativo es una mezcla de anticuerpos monoclonales conjugados con los mismos fluorocromos (FITC y PE) que los reactivos del análisis. Los anticuerpos de control son específicos de antígenos no presentes en los leucocitos humanos. El control debe utilizarse para teñir una parte alícuota separada de cada muestra del paciente.

Para cada muestra de paciente, el área de adquisición de linfocitos definida con BD Leucogate™ (tubo A) y los marcadores de fluorescencia determinados mediante el control (tubo B) se emplean para analizar los tubos siguientes (de C a F). Cuando se ha seleccionado la opción de software Quadrant Correction (Corrección de cuadrante) en el Main Menu (Menú principal) del software BD Simultest™ IMK Plus, las subpoblaciones de linfocitos de los tubos de C a F se enumeran y después se expresan como porcentajes de los linfocitos del área de selección. El software BD Simultest™ IMK Plus proporciona un informe que cuantifica estas subpoblaciones de linfocitos significativas desde el punto de vista inmunológico de LWB como porcentajes de los linfocitos (no blastocitos) humanos circulantes totales e indica una proporción de linfocitos $CD4^+/CD8^+$. Si no se selecciona esta opción del software, los resultados se expresarán como porcentajes de los eventos totales del área de selección.

Con fines de control de calidad, una fórmula leucocitaria en tres partes para porcentajes de monocitos, granulocitos y linfocitos se determina automáticamente mediante el software y se imprime solamente para compararla con los resultados de una fórmula leucocitaria estándar de laboratorio.[23] Para obtener una fórmula leucocitaria en tres partes, el software utiliza un algoritmo para identificar las tres poblaciones celulares basándose en la FSC, la SSC y la fluorescencia. Los monocitos son positivos para CD14 y tienen una señal de SSC intermedia entre la de los linfocitos y los granulocitos. Los linfocitos y granulocitos pueden distinguirse también teniendo en cuenta su señal de SSC. Los linfocitos muestran una señal de SSC baja, mientras que la de los granulocitos es alta.

NOTA La fórmula leucocitaria proporcionada por BD Simultest™ IMK Plus debe utilizarse solamente para realizar una comparación con una fórmula leucocitaria independiente con fines de control de calidad y no debe sustituir a una fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente en las historias clínicas de los pacientes ni introducirse en el software BD Simultest™ IMK Plus para obtener recuentos absolutos.

4. REACTIVOS

Reactivos suministrados, suficientes para 50 análisis

Todos los reactivos de anticuerpos monoclonales contienen inmunoglobulinas murinas conjugadas con FITC o PE en 1,0 ml de solución salina tamponada con gelatina y azida sódica al 0,1 %. Los anticuerpos monoclonales se obtienen de la fusión de células de mieloma de ratón con células esplénicas o células de

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 164 de 196

ganglios linfáticos de ratones BALB/c. La proporción fluoresceína-proteína (F:P) para los reactivos de anticuerpos monoclonales de BD está dentro del intervalo de 2 a 10. La proporción F:P para cada reactivo se ha optimizado para su uso previsto.

Reagent A, BD Leucogate™ (CD45/CD14), 1,0 ml

BD Leucogate™ (CD45/CD14) se utiliza para definir y evaluar el área de selección de dispersión de la luz que distingue los linfocitos de los granulocitos, los monocitos, los eritrocitos no lisados o nucleados, y los residuos. Este reactivo contiene CD45 marcado con FITC, clon 2D1,[24-26] para la identificación de leucocitos, y CD14 marcado con PE, clon MϕP9,[27-29] para la identificación de monocitos.

El anticuerpo CD45[30] se obtuvo de la hibridación de células de mieloma de ratón NS-1 con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). El anticuerpo está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa. El antígeno CD45 está presente en todos los leucocitos humanos y participa en la transducción de señales, modificando las señales procedentes de otras moléculas de superficie.[30] El peso molecular del antígeno reconocido por este anticuerpo es de 170 a 220 kilodaltons (kDa).[30]

El anticuerpo CD14[27] se obtuvo de la hibridación de células de mieloma Sp2/0 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con monocitos de sangre periférica de un paciente con artritis reumatoide. El anticuerpo está compuesto por cadenas pesadas de IgG_{2b} y cadenas ligeras kappa de ratón. El peso molecular del antígeno CD14 reconocido por este anticuerpo es de 53 kDa.[31] El antígeno es un antígeno de diferenciación mieloide[31] y está presente en el 75 % al 90 % de los monocitos humanos.[32] El anticuerpo CD14 reacciona débilmente frente a los granulocitos.[33]

Reactivo B, control, 1,0 ml

El reactivo de control con isotipo se utiliza para definir los marcadores de cuadrante FL1 y FL2 alrededor de la población de linfocitos no teñidos (negativos) con el fin de establecer un límite entre las poblaciones celulares negativas y positivas, y calcula la unión de anticuerpos inespecífica de antígenos, especialmente aquella causada por receptores Fc. Contiene anticuerpos monoclonales murinos IgG_1 marcados con FITC, clon X40, e IgG_{2a} marcados con PE, clon X39, que reaccionan específicamente con la hemocianina de lapa californiana (KLH), un antígeno que no está presente en los leucocitos humanos.

Reactivo C, CD3/CD19, 1,0 ml

CD3/CD19 se utiliza para realizar un hemograma de linfocitos T y B. Contiene CD3 marcado con FITC, clon SK7,[34-37] para la identificación de linfocitos T, y CD19 marcado con PE, clon 4G7,[38] para la identificación de linfocitos B.

El anticuerpo CD3[36] se obtiene de la hibridación de células de mieloma NS-1 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con timocitos humanos. Este anticuerpo está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón. CD3 reacciona con la cadena épsilon del complejo antígeno CD3/receptor del antígeno de células T (TCR). Este complejo está formado por al menos cuatro proteínas, con pesos moleculares de 20 a 30 kDa.[39] El antígeno reconocido por los anticuerpos CD3 se asocia de forma no covalente a TCR α/β o γ/δ (de 70 a 90 kDa).[40]

El anticuerpo CD19[38] se obtiene de la hibridación de células de mieloma P3-X63-Ag8.653 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con células de leucemia linfocítica crónica (LLC) humanas. El anticuerpo está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa. El antígeno CD19 está presente en los linfocitos B humanos en todas las fases de maduración, pero se pierde en las células plasmáticas. El antígeno puede intervenir en la activación y la proliferación de linfocitos B.[41] El peso molecular del antígeno reconocido por este anticuerpo es de 90 kDa.[41]

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Reactivo D, CD4/CD8, 1,0 ml

CD4/CD8 se utiliza para caracterizar simultáneamente linfocitos colaboradores/inductores y supresores/citotóxicos. Contiene CD4 marcado con FITC, clon SK3,[42,43] para la identificación de linfocitos colaboradores/inductores, y CD8 marcado con PE, clon SK1,[42,43] para la identificación de linfocitos supresores/citotóxicos.

El anticuerpo CD4[42] se obtiene de la hibridación de células de mieloma NS-1 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con linfocitos T de sangre periférica humana. Está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón. El anticuerpo CD4 reconoce el antígeno CD4, que interactúa con las moléculas del CHP de clase II y es el receptor principal del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).[44,45] El antígeno posee un peso molecular de 59 kDa. La parte citoplásmica del antígeno está asociada con la proteína tirosina quinasa $p56^{lck}$. El antígeno CD4 puede regular la función del complejo de antígeno CD3/TCR.[46] CD4 reacciona con los monocitos/macrófagos y los linfocitos T colaboradores/inductores.[47]

El anticuerpo CD8[42] se obtiene de la hibridación de células de mieloma NS-1 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con linfocitos T de sangre periférica humana. Está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa de ratón. El antígeno CD8 está presente en la subpoblación de linfocitos T supresores/citotóxicos humanos,[35,43] así como en una subpoblación de linfocitos NK.[16] El determinante CD8 antigénico interactúa con las moléculas del CHP de clase I, dando como resultado una mayor adhesión entre los linfocitos T $CD8^+$ y células diana.[48-50] La unión del antígeno CD8 con las moléculas del CHP de clase I mejora la activación de los linfocitos T en reposo.[48-51] El antígeno CD8 se expresa como un complejo bimolecular con puentes de disulfuro con una subunidad α de 32 kDa.[52,53] El antígeno CD8 se asocia con $p56^{lck}$. El complejo CD8:$p56^{lck}$ puede desempeñar un papel en la activación de linfocitos T a través de la mediación de las interacciones entre el antígeno CD8 y el complejo de antígeno CD3/TCR.[50,51]

Reactivo E, CD3/Anti–HLA-DR, 1,0 ml

CD3/Anti–HLA-DR se utiliza para enumerar los linfocitos T, linfocitos DR^+ no T (principalmente, linfocitos B) y linfocitos T activados. Contiene CD3 marcado con FITC, clon SK7,[34–37] para la identificación de linfocitos T, y Anti–HLA-DR marcado con PE, clon L243,[54] para la identificación de linfocitos DR^+ no T y linfocitos T activados.

El anticuerpo Anti–HLA-DR se obtiene de la hibridación de células de mieloma NS1/1-AG4 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con la estirpe de células B linfoblastoides humanas RPMI 8866. Está compuesto por cadenas pesadas de IgG_{2a} y cadenas ligeras kappa de ratón. El antígeno HLA-DR (antígeno leucocitario humano relacionado con el locus D) es una molécula del CHP de clase II humana. El antígeno es una glucoproteína transmembrana compuesta por subunidades α y β con pesos moleculares de 36 y 27 kDa, respectivamente.[54,55] El anticuerpo reacciona con un epítopo HLA-DR no polimórfico.[54-56] El antígeno se expresa en los linfocitos B, monocitos, macrófagos, linfocitos T activados, linfocitos citolíticos naturales activados y células progenitoras humanas.[14,19,57-60].

Reactivo F, CD3/CD16+CD56, 1,0 ml

CD3/CD16+CD56 se utiliza para identificar linfocitos T y citolíticos naturales. Contiene CD3 marcado con FITC, clon SK7,[34–37] para identificar linfocitos T. Contiene también CD16 marcado con PE, clon B73.1,[61-64] y CD56 marcado con PE, clon MY31,[63,65] para identificar las poblaciones de linfocitos citolíticos naturales, así como las subpoblaciones de linfocitos-T.

El anticuerpo CD16[64] se obtuvo de la hibridación de células de mieloma P3X-63-Ag8.653 de ratón con células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con linfocitos citolíticos naturales. El anticuerpo está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa.[61–63] El antígeno reconocido por los

ORTEGAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

anticuerpos CD16 es una proteína de 50 a 65 kDa que es el receptor para el Fc III de la IgG presente en los linfocitos citolíticos naturales y neutrófilos.[20]

El anticuerpo CD56[65] se obtuvo de la hibridación de células de mieloma Sp2/0 de ratón con células esplénicas de ratones (B6xBALB/c)F_1 inmunizados con la estirpe celular KG1a. El anticuerpo está compuesto por cadenas pesadas de IgG_1 y cadenas ligeras kappa. El peso molecular del antígeno glucosilado reconocido por este anticuerpo está dentro del intervalo de 175 a 220 kDa,[2066] (o 137 kDa cuando no está glucosilado[67]) y está presente en los linfocitos citolíticos naturales. El antígeno CD56 interviene en la adhesión de células homotípicas neuronales y en la diferenciación celular durante la embriogénesis.[65]

Reactivo G, BD Simultest™ IMK Plus Lysing Solution (10X), 60 ml

El reactivo G contiene solución de lisado tamponada (10X), con menos del 50 % de dietilenglicol y menos del 10 % de formaldehído. Cuando se almacena a una temperatura de 2–25 °C, el concentrado 10X es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Para usarlo, diluya a 1:10 con agua apta para reactivos a temperatura ambiente (20–25 °C). Conserve en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente. La solución preparada se mantendrá estable durante un mes a temperatura ambiente.

Las concentraciones se muestran en la tabla siguiente:

Reactivo	Componente	Concentración (µg/ml)
A: BD Leucogate™ (CD45/CD14)	CD45 FITC	25
	CD14 PE	12,5
B: Control	IgG_1 FITC	25
	IgG_{2a} PE	12,5
C:CD3/CD19	CD3 FITC	25
	CD19 PE	6
D: CD4/CD8	CD4 FITC	1,5
	CD8 PE	25
E: CD3/HLA-DR	CD3 FITC	25
	Anti-HLA-DR PE	3,1
F: CD3/CD16+CD56	CD3 FITC	25
	CD16 PE	12,5
	CD56 PE	25

Precauciones

- Para uso diagnóstico in vitro.
- Cuando se almacenan a una temperatura de 2–8 °C, los reactivos de anticuerpos se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No se debe utilizar después de la fecha de caducidad.
- Los reactivos de anticuerpos no se deben congelar ni exponer a la luz directa durante el almacenamiento o la incubación con células.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

- Si se utilizan temperaturas o tiempos de incubación o centrifugación distintos de los especificados, pueden producirse errores.
- Para obtener resultados óptimos, tiña las muestras de sangre en las 6 horas siguientes a la venopunción.
- Cualquier alteración en el aspecto de los reactivos, como precipitación o decoloración, es un indicio de inestabilidad o deterioro. En ese caso, no utilice los reactivos.
- Los reactivos de anticuerpos contienen azida sódica como conservante. Sin embargo, es preciso extremar las precauciones para evitar la contaminación microbiana, que podría causar resultados erróneos.
- El reactivo G contiene 2,2´-oxibisetanol (dietilenglicol) al 31,345 %, número CAS 111-46-6; formaldehído al 9,77 %, número CAS 50-00-0; y metanol al 3,433 %, número CAS 67-56-1. La solución de lisado se clasifica como peligrosa según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA). Visite regdocs.bd.com para descargar la ficha de datos de seguridad.

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

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

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

ADVERTENCIA Se consideran de riesgo biológico todas las muestras biológicas y todos los materiales que hayan entrado en contacto con ellas. Manipular como si pudieran transmitir alguna infección[68,69] y desechar tomando las precauciones adecuadas según la normativa federal, estatal y local. Nunca pipetee con la boca. Utilice ropa protectora, protección ocular y guantes adecuados.

5. INSTRUMENTO

El kit BD Simultest™ IMK Plus se ha diseñado para utilizarse en un citómetro de flujo de BD equipado con el hardware, el software y la electrónica de conmutación informáticos adecuados. El citómetro de flujo debe estar equipado para detectar fluorescencia bicolor, dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC).

Se recomienda utilizar el siguiente sistema de instrumentos:

- Sistema de citómetro de flujo BD FACScan™ equipado para la detección de fluorescencia tricolor y la detección de dispersión de la luz de dos parámetros. Para obtener información de uso detallada, consulte el documento *BD FACScan™ User's Guide* (Guía del usuario de BD FACScan™).
- Sistema informático BD CONSORT™ 30 o BD CONSORT™ 32 y periféricos (incluidos en el sistema BD FACScan™). Para obtener información de uso detallada, consulte el documento *BD CONSORT™ 30 Software User's Guide* (Guía de usuario del software BD CONSORT 30) o *BD CONSORT™ 32 System User's Guide* (Guía de usuario del sistema BD CONSORT 32).
- Software BD Simultest™ IMK Plus. Para obtener información de uso detallada, consulte el documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK Plus).

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15842
Gerente Técnico

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

- BD Calibrite™ Beads (n.º de catálogo 349502). Estas microesferas se utilizan para configurar los voltajes de tubo fotomultiplicador (PMT), ajustar la compensación de fluorescencia y verificar la sensibilidad del instrumento en el citómetro de flujo BD FACScan™. Para obtener información de uso detallada, consulte las instrucciones de uso de BD Calibrite™ Beads.
- Software AutoComp™. Para obtener más información sobre el uso, consulte el documento *AutoComp™ Software User's Guide* (Guía de usuario del software AutoComp).

Todas las características de rendimiento se obtuvieron con el sistema de instrumento citado arriba. Otros sistemas pueden tener características diferentes.

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Recoja sangre asépticamente por venopunción[5,70] utilizando un BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tube (tapón lavanda) estéril. Para este procedimiento se necesita como mínimo 1 ml de sangre completa. Para obtener resultados óptimos, la sangre debe teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. La sangre con anticoagulante puede almacenarse a temperatura ambiente (20–25 °C) durante un máximo de 6 horas hasta que esté lista para la tinción. Las muestras de sangre refrigeradas antes de la tinción pueden dar resultados anómalos.

Deben hacerse un hemograma de leucocitos y una fórmula leucocitaria a partir de la misma muestra de sangre completa antes de la tinción. Se considera aceptable un intervalo de concentración de leucocitos de $3,5 \times 10^3$ a $9,8 \times 10^3$ leucocitos/µl. Las muestras con recuentos superiores a $9,8 \times 10^3$ leucocitos/µl puede que tengan que diluirse con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X que contenga azida sódica al 0,1 % (consulte la sección 9, Limitaciones). Para muestras con recuentos inferiores a $3,5 \times 10^3$ leucocitos/µl podría ser necesaria más sangre, así como un procedimiento de separación para concentrar las células.

Condiciones que causan interferencias

No deben utilizarse células previamente fijadas y almacenadas. Las muestras de sangre completa refrigeradas antes de la tinción pueden dar resultados anómalos. Para obtener resultados óptimos, las muestras de sangre deben teñirse en las 6 horas siguientes a la venopunción. Las muestras obtenidas de pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores pueden ofrecer una escasa diferenciación. La presencia de células (blastocitos) anómalas o de eritrocitos no lisados o nucleados puede interferir en los resultados del análisis. Deben rechazarse las muestras hemolizadas o las muestras con menos de 1 ml de sangre completa en el tubo de recogida.

PRECAUCIÓN Tome las precauciones habituales al recoger, manipular y desechar todas las muestras de sangre humana y reactivos potencialmente cancerígenos.

7. PROCEDIMIENTO

Reactivos suministrados

Consulte Reactivos suministrados, suficientes para 50 análisis y Precauciones en la sección 4, Reactivos.

Reactivos y materiales necesarios que no se suministran

- BD Vacutainer® EDTA Blood Collection Tubes o equivalentes.
- Tubos de ensayo Falcon desechables de poliestireno de 12 × 75 mm o equivalente.
- Agitador vorticial.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

- Centrifugadora de baja velocidad (200 *g*) con rotor de cesto giratorio y soportes para tubos de 12 × 75 mm.
- Aspirador de vacío con depósito.
- Micropipeta con puntas.
- Tampón de lavado de PBS con azida sódica al 0,1 %.
- Solución fijadora (solución de paraformaldehído [PFA] al 1 % en PBS 1X con azida sódica al 0,1 %).

  Almacene a una temperatura de 2–8 °C en un recipiente de vidrio ámbar durante un máximo de 1 semana.
- BD FACSFlow™ Sheath Fluid (n.º de catálogo 342003).

  PRECAUCIÓN Utilice únicamente diluyente BD FACSFlow™ Sheath Fluid para diluir BD Calibrite™ Beads.
- Agua apta para reactivos (destilada y desionizada).

Tinción y fijación de las células

Las muestras de sangre completa se tiñen en primer lugar con los reactivos A a F. El reactivo G diluido, BD Simultest™ IMK Plus Lysing Solution 1X, se utiliza para lisar los eritrocitos después de la tinción. Si el recuento de leucocitos es suficiente, no es necesaria una separación de células antes de la tinción. Consulte la sección 6, Recogida y preparación de muestras, y la sección 9 Limitaciones. Evite exponer los tubos a la luz directa. Realice el procedimiento a temperatura ambiente (20–25 °C) utilizando reactivos a temperatura ambiente. Consulte el punto Precauciones en la sección 4, Reactivos.

1. Para cada muestra del paciente, etiquete seis tubos de 12 x 75 mm como A a F. Además, etiquete cada tubo con el número de identificación de la muestra.
2. Ponga 20 µl de Reactivo A en el tubo A, 20 µl de Reactivo B en el tubo B, 20 µl de Reactivo C en el tubo C, 20 µl de Reactivo D en el tubo D, 20 µl de Reactivo E en el tubo E y 20 µl de Reactivo F en el tubo F.
3. Para cada muestra del paciente, utilice una punta de micropipeta nueva y añada con cuidado 100 µl de la muestra de sangre completa del paciente con anticoagulante bien mezclada a la concentración correcta en el fondo de cada uno de los seis tubos etiquetados. La concentración de leucocitos necesaria es de 3,5 x 10^3 a 9,8 x 10^3 leucocitos/µl. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

   NOTA Proteja las muestras de la luz directa durante este procedimiento de incubación y tenga cuidado para evitar que se vierta sangre por el lateral del tubo. Si queda sangre completa en el lateral del tubo, esta podría no teñirse con el reactivo.
4. Diluya BD Simultest™ IMK Plus Lysing Solution (10X) a 1X siguiendo las instrucciones para el reactivo G que se indican en Reactivos suministrados, suficientes para 50 análisis, en la sección 4, Reactivos. Añada 2 ml de solución de lisado 1X a temperatura ambiente (20–25 °C) en cada tubo. Agite a conciencia inmediatamente en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos e incube durante 10 a 12 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (20–25 °C). No incube durante más de 12 minutos.

   NOTA Evite la exposición prolongada de las células a los reactivos líticos, ya que podría provocar la destrucción de leucocitos. Consulte la sección 9, Limitaciones.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

5. Inmediatamente después de la incubación, centrifugue los tubos a 300 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).
6. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en cada tubo para no afectar al sedimento celular.
7. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para resuspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 2 ml de PBS con azida sódica al 0,1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Centrifugue a 200 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).
8. Aspire el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 µl de líquido residual en el tubo para no afectar al sedimento celular.
9. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad para volver a suspender el sedimento celular en el líquido residual y, a continuación, añada 0,5 ml de solución de paraformaldehído al 1 % en PBS 1X con azida sódica al 0,1 % en cada tubo. Agite a conciencia en el agitador vorticial a baja velocidad durante 3 segundos. Compruebe que las células estén bien mezcladas con la solución fijadora.
10. Las células ya están listas para analizarse en el citómetro de flujo. Tape o cubra los tubos preparados y almacénelos a una temperatura de 2–8 °C en un lugar oscuro hasta el momento del análisis por citometría de flujo. Analice las células fijadas en las 24 horas posteriores a la tinción. Agite a conciencia las células en el agitador vorticial (a baja velocidad) antes de colocarlas en el citómetro de flujo para ayudar a reducir la agregación.

Citometría de flujo

Siga las instrucciones de BD para el análisis por citometría de flujo bicolor y consulte la sección 5, Instrumento. Se recomienda utilizar el método general siguiente. El citómetro de flujo BD FACScan™ se prepara en primer lugar para el análisis de la muestra utilizando BD Calibrite™ Beads y el software AutoComp™. Los tubos de muestras teñidas se procesan después en el citómetro de flujo y se analizan con el software BD Simultest™ IMK Plus. Consulte el documento *BD FACScan™ User's Guide* (Guía del usuario de BD FACScan™), las instrucciones de uso de BD Calibrite™ Beads, el documento *AutoComp™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software AutoComp™) y el documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK Plus) para ver instrucciones de uso detalladas. Es aconsejable guardar los datos del paciente para permitir posteriores análisis de los archivos de datos.

Configure y ajuste la compensación del citómetro de flujo BD FACScan™. Mediante el uso de BD Calibrite™ Beads y el software AutoComp™, defina los voltajes de tubo fotomultiplicador (PMT), ajuste la compensación de fluorescencia y compruebe la sensibilidad del detector. Consulte las instrucciones de uso de BD Calibrite™ Beads, el documento *AutoComp™ Software User's Guide* (Guía del usuario del software AutoComp™) y el documento *BD FACScan™ User's Guide* (Guía del usuario de BD FACScan™) para obtener información detallada.

Procese todos los tubos de muestra con el citómetro de flujo y adquiera los datos en archivos de modo de lista utilizando el software BD Simultest™ IMK Plus. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK Plus) para obtener instrucciones detalladas de uso del software. El software recoge automáticamente un número de eventos suficiente para obtener un mínimo de 2000 linfocitos dentro del área de selección de linfocitos. El software cuenta el número de eventos que hay en cada cuadrante y luego calcula un porcentaje de eventos de linfocitos positivos para el cuadrante 1 (C1) (amarillo verdoso bajo/rojo anaranjado alto), C2 (amarillo verdoso alto/rojo anaranjado alto, o fluorescencia dual), C3 (amarillo verdoso bajo/rojo anaranjado bajo) y C4 (amarillo verdoso alto/rojo anaranjado bajo) (consulte la figura 1).

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

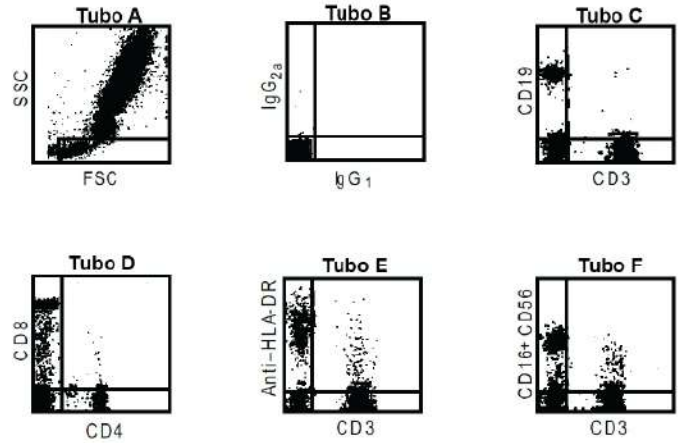
Figura 1 Cuadrantes de la pantalla de fluorescencia (indicados como C1 a C4) y colores correspondientes.

C1 Amarillo verdoso bajo/ rojo anaranjado alto	C2 Amarillo verdoso alto/ rojo anaranjado alto (fluorescencia dual)
C3 Amarillo verdoso bajo/rojo anaranjado bajo	C4 Amarillo verdoso alto/ rojo anaranjado bajo

El tubo A de BD Leucogate™ se utiliza para fijar un área de selección en linfocitos. El software BD FACScan™ con BD Simultest™ IMK Plus establece automáticamente un área de adquisición de linfocitos para eliminar la mayoría de residuos, monocitos y granulocitos (consulte la figura 2 y la figura 3). Consulte el documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK Plus) para obtener información sobre cómo definir el área de selección. Si la separación entre las poblaciones es inadecuada, se marcará la muestra para advertir al operador y se mostrará un mensaje. La preparación de la muestra o la configuración del instrumento pueden causar errores en la definición de las áreas de selección de muestras.

El tubo de control B se utiliza para definir los marcadores de intensidad de fluorescencia. El software BD Simultest™ IMK Plus utiliza automáticamente el área de adquisición de linfocitos definida con BD Leucogate™ y, a continuación, establece los marcadores FL1 y FL2. Estos marcadores definen los límites entre los eventos teñidos positivamente y los no teñidos del área de selección de linfocitos. Se deben ajustar los marcadores de fluorescencia alrededor de la población negativa que se muestra como el grupo de sucesos bajos, tanto en fluorescencia amarilla verdosa como roja anaranjada.

Figura 2 Muestra de LWB de BD FACScan™ de un paciente masculino normal desde el punto de vista hematológico teñida con reactivos BD Simultest™ IMK Plus. BD Leucogate™ (CD45/CD14) se utilizó para reducir los residuos, los monocitos y los granulocitos en el área de selección que se muestra en el tubo A. Se muestran gráficos de puntos de FL1 (eje X) frente a FL2 (eje Y) para los tubos B a F.



ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

Tras la definición de los marcadores, si más del 5 % de los recuentos totales para el tubo B permanecen en C1 (amarillo verdoso bajo/rojo anaranjado alto), C2 (amarillo verdoso alto/rojo anaranjado alto) y C4

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

(amarillo verdoso alto/rojo anaranjado bajo), se sospecha que hay unión de anticuerpos inespecífica de antígenos. El software lo notifica al operador con un mensaje «too much nonspecific staining» (demasiada tinción inespecífica). Si se muestra este mensaje de error, debe obtenerse una muestra nueva de la parte alícuota original de sangre completa con anticoagulante y repetirse todo el proceso de tinción.

Figura 3 Poblaciones de células mononucleares en C1 a C4 para los tubos de C a F. Las poblaciones representan la reactividad primaria de los reactivos. (Para ver una lista completa de reactividad, consulte las descripciones de los reactivos en Reactivos suministrados, suficientes para 50 análisis en la sección 4, Reactivos).

Tubo C (CD3/CD19)

C1 Linfocitos B $CD3^-CD19^+$	C2 Unión de anticuerpos inespecífica de antígenos[a]
C3 Linfocitos no teñidos; monocitos, granulocitos y residuos contaminantes	C4 Linfocitos T $CD3^+CD19^-$

Tubo D (CD4/CD8)

C1 Linfocitos supresores/ citotóxicos $CD4^-CD8^+$ y citolíticos naturales	C2 Linfocitos $CD4^+CD8^+$
C3 Linfocitos no teñidos; granulocitos y residuos	C4 Linfocitos colaboradores/ inductores $CD4^+CD8^-$; monocitos

a. Consulte la sección 9, «Limitaciones».

Tubo E (CD3/Anti–HLA-DR)

C1 Linfocitos B $CD3^-$Anti–HLA-DR^+, linfocitos citolíticos naturales activados; monocitos/macrófagos	C2 Linfocitos T activados $CD3^+$Anti–HLA-DR^+
C3 Linfocitos no teñidos; monocitos, granulocitos y residuos contaminantes	C4 Linfocitos T $CD3^+$Anti–HLA-DR^-

Tubo F (CD3/CD16+CD56)

C1 Linfocitos citolíticos naturales $CD3^-CD16^+CD56^+$	C2 Subpoblación de linfocitos T $CD3^+CD16^+CD56^+$
C3 Linfocitos no teñidos; monocitos, granulocitos y residuos contaminantes	C4 Linfocitos T $CD3^+CD16^-CD56^-$

Los datos de los tubos C, D, E y F se adquieren y analizan mediante el software BD Simultest™ IMK Plus utilizando las áreas de selección y los marcadores establecidos con los tubos A y B. Analice estos resultados utilizando los criterios proporcionados en «Control de calidad» y de acuerdo con las instrucciones de la sección 8, Resultados.

Control de calidad

Para obtener resultados óptimos, se recomienda utilizar BD Calibrite™ Beads y el software AutoComp™ para configurar los voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT), ajustar la compensación de fluorescencia y verificar la sensibilidad del instrumento antes de usar los reactivos BD Simultest™ IMK Plus en el citómetro de flujo BD FACScan™. Consulte el apéndice A del documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK Plus) para obtener información sobre la optimización del citómetro de flujo antes de analizar muestras de pacientes.

El control negativo suministrado en el kit de reactivos BD Simultest™ IMK Plus se procesa con cada muestra de paciente para definir los marcadores FL1 y FL2 entre grupos de linfocitos teñidos negativa y positivamente, así como para detectar la presencia de unión de anticuerpos inespecífica de antígenos, que indicaría resultados erróneos del paciente. Examine la pantalla del ordenador y el informe de laboratorio para el tubo de control B. Si más del 5 % de los eventos se encuentra fuera del cuadrante 3 para el tubo de control, se muestra un mensaje «too much nonspecific staining» (demasiada tinción inespecífica) para el tubo B. En este caso, los resultados para los tubos de C a F deben considerarse no fiables. Consulta la

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

sección 12, Solución de problemas, al final de estas instrucciones de uso. Es necesario realizar un examen visual de los gráficos de puntos para los tubos de C a F para garantizar que los marcadores de fluorescencia estén correctamente definidos y que la unión de anticuerpos inespecífica de antígenos sea mínima.

Se recomienda analizar diariamente una muestra de control de un sujeto adulto normal para optimizar los parámetros del instrumento y como comprobación de control de calidad del sistema. En la figura 2 se muestran los resultados correctos de un paciente normal desde el punto de vista hematológico.

Si se observa una separación escasa entre los grupos negativo y positivo en el examen visual de los gráficos de puntos o visualizaciones de contornos, puede deducirse que hay unión de anticuerpos inespecífica de antígenos y deberá rechazarse el procesamiento. La unión de anticuerpos inespecífica de antígenos puede deberse a un mal estado de las células. Consulte la sección 12, Solución de problemas, si se observa unión de anticuerpos inespecífica de antígenos.

El software BD Simultest™ IMK Plus examinará automáticamente los datos y alertará al operador mediante una serie de posibles mensajes de error. Consulte el apéndice D del documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK Plus) para obtener una lista de los posibles mensajes. El software utiliza los criterios siguientes para el examen de los gráficos de puntos obtenidos para cada muestra a fin de evaluar la calidad de los datos obtenidos.

1. El operador debe rechazar cualquier resultado si recibe cualquiera de los mensajes de error siguientes para el control normal: no separation between cellular populations (no hay separación entre poblaciones celulares); too few lymphocytes (less than 500) (linfocitos demasiado escasos [menos de 500]); excessive RBC or nucleated RBC contamination and debris (greater than 20%) (contaminación con eritrocitos excesivos o eritrocitos nucleados y residuos [superior al 20 %]); o excessive monocyte (greater than 4%) or granulocyte (greater than 4%) contamination of the lymphocyte gate (contaminación excesiva con monocitos [superior al 4 %] o granulocitos [superior al 4 %] del área de selección de linfocitos).
2. Si no hay un motivo obvio para que falle el control normal, debe volver a teñirse y procesarse una muestra de otro control normal y repetirse todo el procedimiento de tinción en todas las muestras siguientes.
3. Las muestras con eritrocitos nucleados pueden contener un exceso de residuos debido a una lisis incompleta de estos con el reactivo G, BD Simultest™ IMK Plus Lysing Solution. El exceso de residuos puede suceder también cuando se analizan muestras de sangre de pacientes que padecen determinadas alteraciones hematológicas que dificultan la lisis de los eritrocitos como, por ejemplo, mielofibrosis y esferocitosis. Los eritrocitos nucleados se contarán como residuos y, si estos superan el 20 %, el software marcará la muestra como «too many nonlymphs in gate» (demasiadas células distintas de linfocitos en el área de selección) y sus resultados deberán rechazarse.
4. El operador deberá comprobar que la fórmula leucocitaria de BD Simultest™ IMK Plus esté dentro de ±10 % de la fórmula leucocitaria independiente. Si el recuento de BD Simultest™ IMK Plus está fuera del intervalo, existe una discrepancia y deberá cuestionarse el análisis. O bien el recuento de BD Simultest™ IMK Plus tiene un error, o bien o la fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente es incorrecta. Consulte la sección 9, Limitaciones.
5. El operador deberá comprobar que coincidan los porcentajes de linfocitos T entre los tubos C, E y F que contienen $CD3^+$. Deberá rechazarse el análisis si los valores de linfocitos T totales en dos cualesquiera de los tres tubos difieren en más de un 8 %.
6. Los linfocitos colaboradores/inductores y supresores/citotóxicos no se añadirán a los linfocitos T totales porque el antígeno CD8 también se expresa en los linfocitos citolíticos naturales. La uniformidad interna del ensayo se puede indicar cuando la suma de los porcentajes de linfocitos T, B y citolíticos naturales es

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

del 100 % ±5 % cuando se selecciona la opción Quadrant Correction (Corrección de cuadrante) en el Main Menu (Menú principal) del software BD Simultest™ IMK Plus. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK Plus) para obtener instrucciones sobre la selección de esta opción.

Consulte también Solución de problemas, sección 12, al final de estas instrucciones de uso.

8. RESULTADOS

Cálculo de recuentos corregidos

Cuando se selecciona la opción de software Quadrant Correction (Corrección de cuadrante), el sistema BD FACScan™ con software BD Simultest™ IMK Plus calcula automáticamente cada subpoblación de linfocitos comunicada como un porcentaje de los linfocitos totales del área de adquisición de linfocitos. El software resta en primer lugar las células que no son linfocitos del cuadrante 3 (C3) y, a continuación, notifica los resultados en forma de porcentajes de linfocitos del área de adquisición de linfocitos definida utilizando el tubo de BD Leucogate™ (A).

Cuando se han cumplido todos los criterios indicados en Control de calidad de la sección 7, «Procedimiento», la opción de software Quadrant Correction (Corrección de cuadrante) proporciona cálculos apropiados de los valores de subpoblaciones auténticos. Sin embargo, si no se cumplen los criterios de control de calidad (por ejemplo, debido a una contaminación por células distintas de linfocitos excesivas del área de selección), puede que los resultados no sean fiables. En este caso, es necesario analizar los datos manualmente para determinar el efecto de las células distintas de linfocitos con reactividad cruzada en los resultados. Si la opción Quadrant Correction (Corrección de cuadrante) se desactiva, los resultados se indicarán como un porcentaje de los eventos totales incluidos en el área de selección. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía de usuario de BD Simultest™ IMK Plus).

El principio del cálculo es el siguiente (los valores C hacen referencia a los recuentos en los cuadrantes):

La ecuación 1 calcula el porcentaje de eventos de linfocitos dentro del área de adquisición de linfocitos de BD Leucogate™. Este valor se indica como «%L» en el tubo A en la tabla 1 y refleja la pureza de los linfocitos dentro del área de selección dibujada con el tubo de BD Leucogate™ (A).

Tabla 1 Resumen de los datos representativos de la figura 2 e identificación de los cuadrantes utilizados para calcular subpoblaciones

Tubo	%L[a]	%M[a]	%G[a]	%D[a]	% de linfocitos totales en el área de selección[b]
A (BD Leucogate™)	95	1	3	1	99

Tubo	Tipo de célula	Cuadrante(s)	% de linfocitos (Corregido)	Proporción de colaboradores/supresores[c]
C (CD3/CD19)	Linfocitos T totales	C4	82	—
	Linfocitos B totales	C1	9	

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Tubo	Tipo de célula	Cuadrante(s)	% de linfocitos (Corregido)	Proporción de colaboradores/supresores[c]
D (CD4/CD8)	Linfocitos colaboradores/inductores; monocitos	C2, C4	50	1,2
	Linfocitos supresores/citotóxicos y citolíticos naturales	C1, C2	41	
E (CD3/Anti–HLA-DR)	Linfocitos T totales	C4	81	—
	Linfocitos T activados	C2	18	
F (CD3/CD16+CD56)	Linfocitos T totales	C4	81	—
	Linfocitos citolíticos naturales	C1	7	

a. %L, %M, %G y %D se refieren a los linfocitos, los monocitos, los granulocitos y los residuos del área de selección definida por BD Leucogate™, expresados como porcentajes de todos los eventos de dicha área. Estos valores reflejan la calidad y la pureza del área de selección.

b. El porcentaje del total de linfocitos en el área de selección son los linfocitos del área de selección definida por BD Leucogate™, expresados como un porcentaje de todos los linfocitos de la muestra fuera del área de selección. Este valor mide la proporción de todos los linfocitos incluidos en el área de selección.

c. Proporción de colaboradores/supresores = linfocitos % CD4+/linfocitos % CD8+

N = número total de eventos en el área de selección de linfocitos definida por BD Leucogate™ = L + M + G + D donde:
L = número de linfocitos en el área de selección
M = número de monocitos en el área de selección
G = número de granulocitos en el área de selección
D = número de eventos de residuos en el área de selección.

Ecuación 1. Porcentaje de linfocitos en el área de selección (%L) = L/N x 100

Ecuación 2a. Porcentaje de linfocitos corregidos del área de selección en C1, C2 o C4 =

$$\frac{\text{N.º de eventos en área de selección en C1, C2 o C4}}{N \times (\%L/100)} \times 100$$

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

En la ecuación 2a, los porcentajes de células positivas en cada uno de los tres cuadrantes positivos (C1, C2 y C4) se expresan como porcentajes de linfocitos corregidos, suponiendo que todas las células que no son linfocitos del área de selección definida por BD Leucogate™ sean células no teñidas. Para calcular el factor de corrección en estos cuadrantes, el software utiliza la ecuación 2a para C1, C2 y C4.

NOTA La opción Quadrant Correction (Corrección de cuadrante) no corrige los eventos de células distintas de linfocitos que pueden ocurrir en C1, C2 y C4. Por tanto, los eventos de monocitos positivos para CD4 no son corregidos en C4 por el software.

En la hoja de informe de laboratorio, los valores para las células no teñidas (C3) se indican en «Corr » (%L corr) como el porcentaje de linfocitos corregidos en C3. C3 representa las células no teñidas y, presumiblemente, todos los eventos de células distintas de linfocitos del área de selección, así como los

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

linfocitos no teñidos. Por tanto, además de convertir los resultados del porcentaje de eventos totales en porcentaje de linfocitos del área de selección, la ecuación 2b también resta los eventos de células distintas de linfocitos del área de selección de los eventos de C3 del área de selección.

Ecuación 2b. Porcentaje de linfocitos no teñidos corregidos del área de selección en C3 (%L corr) =

$$\frac{(\text{N.º de eventos en área de selección en C3} - \text{N.º de células no linfocitos en área de selección}) \times 100}{\text{N x (\%L/100)}}$$

donde:

Número de células distintas de linfocitos en el área de selección = número de eventos de residuos en el área de selección + número de granulocitos en el área de selección + número de monocitos en el área de selección. Consulte la tabla 1, tubo A.

Cálculo de recuentos absolutos

Puede calcularse un recuento celular absoluto si se obtienen un recuento de leucocitos y el porcentaje de linfocitos de una fórmula leucocitaria mediante procedimientos de laboratorio estándar. El citómetro de flujo BD FACScan™ con software BD Simultest™ IMK Plus calcula automáticamente un recuento absoluto para cada parámetro de BD Simultest™ IMK Plus si el operador introduce un recuento de leucocitos y el porcentaje de linfocitos de una fórmula leucocitaria para cada muestra de sangre completa del paciente. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK Plus). El principio del cálculo es el siguiente:

1. Introduzca el recuento de leucocitos en leucocitos/µl obtenido de la misma muestra de sangre.
2. Introduzca el porcentaje de linfocitos de una fórmula leucocitaria de laboratorio obtenida de la misma muestra de sangre. No utilice los valores de la fórmula leucocitaria en tres partes obtenidos con el software BD Simultest™ IMK Plus.
3. Los recuentos absolutos para cada subpoblación se calculan después del modo siguiente:

   Recuento absoluto de células $CD4^+$/µl =

$$\frac{\%CD4^+}{100} \times \frac{\%L}{100} \times (\text{WBCs/µl})$$

Si los datos se presentan en recuentos absolutos, el valor y la precisión del intervalo de referencia del recuento absoluto estarán en función de (a) el intervalo de referencia normal del laboratorio y la precisión del recuento de leucocitos, (b) el porcentaje de linfocitos y (c) el intervalo de referencia normal y la precisión del porcentaje de linfocitos positivos para el marcador específico.

Fórmula leucocitaria en tres partes

Para la sangre completa lisada, es posible determinar los monocitos, los linfocitos y los granulocitos como un porcentaje de los leucocitos utilizando el tubo A de BD Leucogate™ (consulte la tabla 2). El sistema BD FACScan™ con software BD Simultest™ IMK Plus calcula automáticamente una forma leucocitaria en tres partes (tabla 2). Consulte el documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK Plus) para obtener impresiones de datos representativos.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Tabla 2 Datos de la fórmula leucocitaria en tres partes de la figura 2

Fórmula leucocitaria en tres partes[a]	% de leucocitos
Linfocitos	25
Monocitos	5
Granulocitos	70

a. La fórmula leucocitaria en tres partes se obtiene mediante la expresión de los linfocitos, los monocitos y los granulocitos en toda la muestra fuera del área de selección como un porcentaje de la suma de los linfocitos, los monocitos y los granulocitos en toda la muestra.

NOTA La fórmula leucocitaria proporcionada por el software BD Simultest™ IMK Plus debe utilizarse solamente para realizar una comparación con una fórmula leucocitaria independiente con fines de control de calidad y no debe sustituir a una fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente en las historias clínicas de los pacientes ni introducirse en el software BD Simultest™ IMK Plus para obtener recuentos absolutos.

9. LIMITACIONES

- Utilice sangre recién recogida y tíñala en las 6 horas siguientes a la venopunción. Antes de proceder a la tinción, guarde la sangre a temperatura ambiente (20–25 °C) porque las células que se han refrigerado antes de la tinción pueden dar resultados anómalos. No se recomienda utilizar células fijadas con anterioridad.
- Las células teñidas y fijadas deben analizarse en las 24 horas siguientes a la tinción.
- Las muestras de sangre completa con recuentos inferiores a 3,5 x 10^3 leucocitos/µl y superiores a 9,8 x 10^3 leucocitos/µl requerirán una manipulación especial para obtener resultados correctos. Las muestras con recuentos superiores a 9,8 x 10^3 leucocitos/µl puede que tengan que diluirse con PBS que contenga azida sódica al 0,1 %. Las muestras con recuentos inferiores a 3,5 x 10^3 leucocitos/µl pueden necesitar más sangre, así como un procedimiento de separación para concentrar las células.
- Algunas variables de confusión, como medicamentos que afectan a las propiedades de las células sanguíneas, pueden producir resultados inexactos. Por ejemplo, se ha observado una escasa diferenciación entre las células positivas y negativas en pacientes sometidos a un trasplante que han sido tratados con medicamentos inmunosupresores. Si se observa una separación escasa entre los grupos negativo y positivo, debe rechazarse el análisis (consulte Solución de problemas, sección 12, al final de estas instrucciones de uso). Si la diferencia en el porcentaje de células T total entre dos de los tres tubos cualesquiera que contienen CD3 es superior al 8 %, deberá rechazarse el análisis.
- Es necesario que los laboratorios definan sus propios intervalos de referencia normales para cada uno de los parámetros de BD Simultest™ IMK Plus que puedan verse afectados por el sexo o la edad del paciente, así como por la técnica utilizada en la preparación. La raza del paciente también puede influir, aunque aún no se dispone de suficientes datos para respaldar esta afirmación. Es necesario conocer la edad, el sexo, el estado clínico y la raza de los sujetos a la hora de determinar un intervalo de referencia.
- Si se desea expresar los resultados en forma de recuentos absolutos, se deberán realizar una fórmula leucocitaria y un recuento de leucocitos independientes en la misma muestra de sangre. No utilice la fórmula leucocitaria del informe del software BD Simultest™ IMK Plus para calcular recuentos absolutos. La fórmula leucocitaria proporcionada por el software BD Simultest™ IMK Plus se imprime solamente

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15449
IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

para realizar una comparación con los resultados de la fórmula leucocitaria realizada por un laboratorio independiente con fines de control de calidad y no debe sustituir a la fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente en las historias clínicas de pacientes ni introducirse en el software BD Simultest™ IMK Plus para obtener recuentos absolutos.

- Si la fórmula leucocitaria de BD Simultest™ IMK Plus difiere de la fórmula leucocitaria independiente en más de ±10 %, existe una discrepancia significativa y debe tenerse cuidado a la hora de interpretar los resultados de los recuentos absolutos. O bien la fórmula leucocitaria de BD Simultest™ IMK Plus tiene un error, o bien la fórmula leucocitaria del laboratorio es incorrecta. Consulte «Control de calidad» en la sección 7, «Procedimiento».
- Una variación en la configuración del área de selección de linfocitos manual o automática cambiará las cantidades relativas de las subpoblaciones analizadas. El software BD Simultest™ IMK Plus utiliza el tubo de BD Leucogate™ (A) para incluir al menos el 95 % de los linfocitos totales en la muestra a fin de definir el área de adquisición de linfocitos y exige un examen visual del área para la validación.
- Los estados de salud anómalos no siempre se reflejan en forma de porcentajes anómalos de linfocitos T o B o de sus subpoblaciones. Esto significa que un individuo con un estado de salud anómalo puede presentar los mismos porcentajes de linfocitos T o B que uno sano. Los resultados de BD Simultest™ IMK Plus deben utilizarse junto con otra información obtenida de la evaluación clínica y procedimientos de diagnóstico independientes adicionales.
- La información obtenida por medio de este kit debe combinarse con otra información y someterse a la interpretación de un profesional de diagnóstico médico cualificado para establecer la presencia o ausencia de estados de enfermedad concretos.
- Tenga en cuenta que los intervalos de referencia normales establecidos por BD para la proporción de linfocitos (colaboradores/supresores) $CD4^+/CD8^+$ se extienden por debajo de una proporción de 1,0 (consulte la tabla 3 de «Subpoblaciones de leucocitos» en la sección 10, Valores esperados).
- La opción Quadrant Correction (Corrección de cuadrante) del software BD Simultest™ IMK Plus presupone que todas las células distintas de linfocitos están sin teñir. Por tanto, los monocitos positivos para CD4 que aparecen en C4 se incluirán como linfocitos positivos para CD4. El límite de contaminación por monocitos permitido es del 4 % antes de que se marque la muestra. Consulte el documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK Plus) para obtener más información sobre la corrección de cuadrante.
- Tenga presente que algunos anticuerpos BD Simultest™ IMK Plus reaccionan con otros elementos formados por células distintas de linfocitos en la sangre. Consulte «Reactividad cruzada» en la sección 11, Características de rendimiento.
- La proporción de linfocitos T colaboradores/supresores determinada por un sistema informático BD CONSORT™ 30 o BD CONSORT™ 32 con software BD Simultest™ IMK Plus puede variar debido a los cambios en distintas subpoblaciones de linfocitos $CD8^+$ que también son positivos para CD16, CD56 o ambos. Estudios de fluorescencia dual que empleen cada uno de estos anticuerpos con CD8 pueden determinar qué poblaciones son responsables de las variaciones.
- Las muestras con eritrocitos nucleados pueden mostrar una lisis incompleta, ya que el reactivo G, BD Simultest™ IMK Plus Lysing Solution, puede que no lise los eritrocitos nucleados. Esto puede suceder también cuando se analizan muestras de sangre de pacientes que padecen determinadas alteraciones hematológicas que dificultan la lisis de los eritrocitos, como mielofibrosis y esferocitosis. Los eritrocitos nucleados se contarán como residuos y, si estos superan el 20 %, el software marcará la muestra como

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 180 de 196

«too many nonlymphs in gate» (demasiadas células distintas de linfocitos en el área de selección). Se recomienda rechazar los resultados de dicha muestra. Cuando se selecciona la opción de software Quadrant Correction (Corrección de cuadrante), el software asume que las células que no son linfocitos, como los eritrocitos nucleados o no lisados, determinadas con reactivo BD Leucogate™, no están teñidas y las resta del C3.

- El software BD Simultest™ IMK Plus comprueba la unión de anticuerpos inespecífica de antígenos solamente en el tubo de control B. El operador debe examinar los resultados impresos en busca de pruebas de unión de anticuerpos inespecífica de antígenos en los tubos siguientes (de C a F). Por ejemplo, en el gráfico de puntos del tubo C, si hay eventos excesivos en C2, debe sospecharse que hay unión de anticuerpos inespecífica de antígenos. La presencia de unión de anticuerpos inespecífica de antígenos puede reflejar un cambio en los reactivos o un error en la preparación de las muestras. Estas muestras deben repetirse.
- La presencia de blastocitos anómalos podría impedir que el reactivo BD Leucogate™ defina un área de adquisición de linfocitos adecuada. El software marcará la muestra y no se imprimirán los resultados.
- Para las muestras de sangre completa, la exposición prolongada de las células al reactivo G, BD Simultest™ IMK Plus Lysing Solution, durante más de 12 minutos puede causar una destrucción de leucocitos (consulte el punto 4 en Tinción y fijación de las células en la sección 7, Procedimiento).
- La capacidad del citómetro de flujo para seleccionar linfocitos y eliminar plaquetas, eritrocitos, residuos, granulocitos y monocitos del recuento de linfocitos depende de la existencia de una clara demarcación entre estos elementos formados y los linfocitos en una visualización de FSC frente a SSC. Para algunos pacientes, esta demarcación no está clara, por lo que la definición del área de selección de linfocitos será menos efectiva.
- Las características de rendimiento se han determinado con los citómetros de flujo BD FACScan™. No se han establecido características de rendimiento con ningún otro instrumento.

10. VALORES ESPERADOS

Subpoblaciones de leucocitos

Se recogen cuatro conjuntos de recuentos para cada tubo, incluido el tubo de control B. Cada recuento se representa en un cuadrante diferente en la pantalla de BD FACScan™ (figura 2).

Las poblaciones celulares presentes en cada cuadrante, para cada tubo, se muestran en la figura 3 de estas instrucciones de uso y en el documento *BD Simultest™ IMK Plus User's Guide* (Guía del usuario de BD Simultest™ IMK Plus). Los resultados clínicamente significativos se encuentran en el informe del médico.[71] BD ha informado de una proporción de linfocitos colaboradores/supresores media de 1,4 y de un intervalo del 95 % de la proporción entre 0,6 y 2,8 en la sangre periférica de 304 sujetos hombres y mujeres sanos de edades comprendidas entre 20 y 70 años.[71]

BD ha investigado los intervalos de referencia normales para los parámetros de BD Simultest™ IMK Plus en sujetos hombres y mujeres normales mediante el citómetro de flujo BD FACScan™ en seis centros (cinco centros clínicos europeos y un centro de EE. UU.). Los intervalos de referencia normales previstos para LWB se muestran en la tabla 3.[71] Los intervalos se presentan como porcentajes de linfocitos corregidos.

Los intervalos obtenidos se analizaron respecto de las diferencias por centro clínico, y por sexo y por edad del sujeto. Para cada parámetro de BD Simultest™ IMK Plus, se realizaron comparaciones no paramétricas entre los valores obtenidos en cada centro de estudio, entre los valores obtenidos para hombres y mujeres, y entre los valores obtenidos para sujetos de entre 18 y 40 años y de entre 41 y 70 años de edad. Si la

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 14.760
Gerente Técnico

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

comparación indicaba una diferencia significativa, los datos de los grupos no se combinaban y se ofrecían intervalos de referencia independientes. El intervalo de referencia normal para los porcentajes de células positivas se calculó por una distribución ajustada.[71] La capacidad de combinar intervalos de referencia para los parámetros de BD Simultest™ IMK Plus (tabla 3) indica la reproducibilidad entre laboratorios.

Existen diferencias pequeñas pero significativas entre sexos para los intervalos de linfocitos T totales determinados por el reactivo F, así como diferencias entre sexos y entre sujetos de 40 años o menos frente a los mayores de 40 años para linfocitos T colaboradores/inductores, proporción de linfocitos $CD4^+/CD8^+$, linfocitos T activados y linfocitos citolíticos naturales.

Tabla 3 Intervalos de referencia representativos[a] para los parámetros de BD Simultest™ IMK Plus en adultos normales desde el punto de vista hematológico como porcentajes de los linfocitos totales (corregidos) (datos agrupados de seis centros clínicos)

Parámetro	Sexo	Edad	n	Media (%)	Intervalo del 95 %[b]
Linfocitos T totales	Masculino	18–70	161	71,3	58,2–84,3
	Femenino	18–70	143	73,9	62,8–85,0
Linfocitos B totales	Ambos	18–70	319	14,0	7,1–23,3
Linfocitos colaboradores/inductores	Masculino	≤40	77	39,9	27,3–52,5
	Masculino	>40	84	43,9	28,5–59,2
	Femenino	≤40	85	44,0	31,4–56,7
	Femenino	>40	58	48,9	34,0–63,8
Linfocitos supresores/citotóxicos	Ambos	18–70	304	33,4	18,9–47,9
Proporción de colaboradores/supresores	Masculino	≤40	77	1,2	0,6–2,2
	Masculino	>40	84	1,5	0,6–3,0
	Femenino	≤40	85	1,3	0,7–2,3
	Femenino	>40	58	1,7	0,8–3,3
Linfocitos T activados	Masculino	≤40	58	9,4	3,5–20,6
	Masculino	>40	67	11,0	3,6–25,9
	Femenino	≤40	64	7,8	2,8–17,3
	Femenino	>40	44	9,1	4,2–17,2
Linfocitos citolíticos naturales	Masculino	≤40	80	13,2	5,4–27,1
	Masculino	>40	88	16,3	6,7–33,5
	Femenino	≤40	91	12,3	4,8–26,1
	Femenino	>40	60	13,6	6,0–26,7

a. Estos datos se recopilaron utilizando reactivos BD Simultest™ IMK Plus, el software BD Simultest™ IMK Plus y el citómetro de flujo BD FACScan™.

b. El intervalo del 95 % se obtiene mediante el ajuste de una distribución adecuada a los datos, seguido del cálculo del área del 95 % central de la distribución ajustada.

No se deben utilizar los intervalos de referencia para adultos con muestras de sangre de pacientes pediátricos (de neonatos a 13 años de edad). Los resultados preliminares de 50 muestras pediátricas (recién nacidos y niños) sugieren que los valores porcentuales respecto a los valores de pacientes adultos pueden

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
GoDiecker Tecnología Argentina

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 182 de 196

ser ligeramente superiores para los linfocitos B totales. Los niños menores de un año tendían a mostrar valores de linfocitos T totales significativamente más bajos.

La raza también puede ser una variable en la definición de los intervalos de referencia normales,[72] aunque BD no ha recopilado datos suficientes para determinarlo. BD presenta más de un límite superior e inferior para los intervalos de la mayoría de los parámetros de BD Simultest™ IMK Plus (tabla 3) debido a las diferencias de edad y sexo observadas.

NOTA Los valores normales previstos pueden variar según la edad, el sexo o la raza del paciente. Debido a estas diferencias, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia normal para cada parámetro.

Recuentos absolutos

El sistema BD FACScan™ con el software BD Simultest™ IMK Plus calcula automáticamente el recuento absoluto si un recuento de leucocitos y el porcentaje de linfocitos de una fórmula leucocitaria o un recuento absoluto de linfocitos se obtienen y se introducen en el software.

NOTA No utilice los valores de fórmula leucocitaria en tres partes obtenidos con BD Simultest™ IMK Plus para determinaciones de recuentos absolutos. La fórmula leucocitaria proporcionada por el software BD Simultest™ IMK Plus debe utilizarse solamente para realizar una comparación con una fórmula leucocitaria independiente con fines de control de calidad y no debe sustituir a una fórmula leucocitaria de un laboratorio independiente en las historias clínicas de los pacientes ni introducirse en el software BD Simultest™ IMK Plus para obtener recuentos absolutos.

Los recuentos absolutos presentarán una variación entre laboratorios significativa según el procedimiento utilizado para obtener los recuentos de leucocitos y la fórmula leucocitaria.

Los recuentos absolutos representativos se muestran en la tabla 4. La tabla se genera a partir de los datos adquiridos en el Laboratoire d'Hématologie, Ecole de Santé Publique, Université Catholique de Louvain (Bélgica), el centro con la mayor población de sujetos de edades comprendidas entre 20 y 70 años. Estos sujetos representan una población seleccionada de 20 a 70 años de edad a los que se aplicó el criterio T + B + NK = 100 ±5 %. Los parámetros de BD Simultest™ IMK Plus se expresaron como un porcentaje de los linfocitos del área de adquisición de linfocitos después de restar las células que no son linfocitos (granulocitos, monocitos y residuos) del cuadrante 3.

Tabla 4 Intervalos de referencia representativos[a] para los parámetros de BD Simultest™ IMK Plus en adultos normales desde el punto de vista hematológico (datos de recuentos absolutos[b] de un centro clínico)

Parámetro	Sexo	Edad	n	Media	Intervalo del 95 %[c]
Leucocitos	Ambos	20–70	98	6,08[d]	3,45–9,76
% linfocitos	Ambos	20–70	98	30,96	20,7–44,6
Linfocitos T totales	Masculino Femenino	20–70 20–70	40 55	1,31 1,39	0,594–1,992 0,772–2,201
Linfocitos B totales	Ambos	20–70	98	0,27	0,109–0,532

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Parámetro	Sexo	Edad	n	Media	Intervalo del 95 %[c]
Linfocitos colaboradores/inductores	Masculino	≤40	11	0,77	0,439–1,112
	Masculino	>40	29	0,82	0,356–1,351
	Femenino	≤40	27	0,86	0,309–1,571
	Femenino	>40	28	0,86	0,496–1,354
Linfocitos supresores/citotóxicos	Ambos	20–70	95	0,58	0,282–0,999
Proporción de colaboradores/supresores	Masculino	≤40	11	1,28	0,865–1,885
	Masculino	>40	29	1,57	0,784–3,100
	Femenino	≤40	27	1,37	0,775–2,375
	Femenino	>40	28	1,84	0,846–3,500
Linfocitos T activados	Masculino	≤40	11	0,14	0,050–0,268
	Masculino	>40	30	0,17	0,042–0,451
	Femenino	≤40	29	0,12	0,034–0,321
	Femenino	>40	28	0,15	0,054–0,496
Linfocitos citolíticos naturales	Masculino	≤40	11	0,19	0,078–0,345
	Masculino	>40	30	0,26	0,102–0,511
	Femenino	≤40	29	0,21	0,072–0,543
	Femenino	>40	28	0,23	0,106–0,605

a. Estos datos se recopilaron utilizando reactivos BD Simultest™ IMK Plus, el software BD Simultest™ IMK Plus y el citómetro de flujo BD FACScan™.

b. Los recuentos absolutos se expresan como 1 x 10^3 células/µl.

c. El intervalo del 95 % se calcula directamente a partir de los datos utilizando los percentiles 2,5 y 97,5.

d. Los datos se obtuvieron con un contador de células automático Technicon™ H6000. (Technicon es una marca comercial de Miles Instruments).

11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El rendimiento de BD Simultest™ IMK Plus se estableció mediante análisis en un centro clínico de EE. UU., en los laboratorios de BD de San Jose (California) o en ambos.

Reproducibilidad intramuestral

Se obtuvieron muestras de sangre de cinco donantes normales y cinco anómalos, se dividieron en partes alícuotas (cuatro veces para las normales y tres veces para las anómalas), se tiñeron con los reactivos BD Simultest™ IMK Plus, se lisaron y se fijaron en las 2 horas siguientes a la tinción. Se llevó a cabo el análisis por citometría de flujo en un plazo de 24 horas en un citómetro de flujo BD FACScan™ en el mismo laboratorio. En la tabla 5 se muestra la reproducibilidad intramuestral media obtenida tanto para sujetos normales como para sujetos anómalos.

Reproducibilidad interinstrumental

Utilizando un protocolo similar al indicado anteriormente, las muestras de sangre completa de diez sujetos normales se dividieron en partes alícuotas, se tiñeron con los reactivos BD Simultest™ IMK Plus y se lisaron.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 12965
Co-Director Técnico

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Las muestras individuales de cada donante se analizaron después en tres citómetros de flujo BD FACScan™ diferentes. Estos resultados se muestran en la tabla 6.

Reproducibilidad entre laboratorios

La reproducibilidad entre laboratorios se indica mediante la capacidad para agrupar los intervalos de referencia normales para los parámetros de BD Simultest™ IMK Plus (tabla 3, en la página 22).

BD Simultest™ IMK Plus frente a métodos comparativos

Los resultados de las partes alícuotas de las mismas muestras de sangre de sujetos normales y anómalos se analizaron con los reactivos BD Simultest™ IMK Plus, BD Simultest™ Immune Monitoring Kit, CD3 FITC y CD19 PE, utilizando LWB y BD FACScan™. Los resultados se compararon mediante una regresión lineal. En la tabla 7 se presenta un resumen de los resultados.

Tabla 5 Reproducibilidad intramuestral de los parámetros de BD Simultest™ IMK Plus (cinco sujetos normales y cinco sujetos anómalos) como porcentajes de linfocitos (corregidos)

Parámetro	Sujetos	n	Media[a] (%)	DE[b]	CV[c]	df[d]
Linfocitos T totales	Normales	5	68,4	1,6	2,2	14[e]
	Anómalos	5	80,4	1,9	2,0	15[e]
Linfocitos B totales	Normales	5	9,5	2,4	21,5	14
	Anómalos	5	9,3	1,0	9,0	15
Linfocitos colaboradores/inductores	Normales	5	46,3	1,5	3,2	15
	Anómalos	5	18,8	2,1	12,2	15
Linfocitos supresores/citotóxicos	Normales	5	34,8	1,3	3,6	15
	Anómalos	5	65,5	2,6	3,7	15
Proporción de colaboradores/supresores	Normales	5	1,4	0,1	5,2	15
	Anómalos	5	0,3	0,04	13,4	15
Linfocitos T activados	Normales	5	6,4	1,5	24,5	15
	Anómalos	5	38,9	1,6	4,3	15
Linfocitos citolíticos naturales	Normales	5	24,7	2,0	7,0	14[e]
	Anómalos	5	12,6	0,9	6,7	15

a. La media es la media combinada, $\bar{Y}$ = la media de las medias individuales.

b. DE = desviación estándar, la desviación estándar combinada.

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1-1)\times s_1^2 + (n_2-1)\times s_2^2 + \ldots + (n_k-1)\times s_k^2}{n_1+n_2+\ldots+n_k-k}}$$

s_i^2 = variación de la muestra i para $1 \le i \le k$.

k = número de muestras.

n = número de observaciones en una muestra.

c. CV = coeficiente de variación

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

d. df = grado de libertad = (número de réplicas – número de medios de donantes) x número de sujetos; 4 alícuotas – 1 media = 3 grados de libertad. Tres grados de libertad para 5 sujetos = 15 grados de libertad, o 1 alícuota x 3 instrumentos – 1 media = 2 grados de libertad. Dos grados de libertad para 10 sujetos = 20 grados de libertad.

e. Una de las réplicas fue desechada por el médico.

Tabla 6 Reproducibilidad interinstrumental para los parámetros de BD Simultest™ IMK Plus (diez sujetos normales) como porcentajes de linfocitos (corregidos)

Parámetro	Media[a] (%)	DE[b]	CV[c]	df[d]
Linfocitos T totales	72,1	2,13	2,29	20
Linfocitos B totales	12,7	1,26	10,59	20
Linfocitos colaboradores/inductores	45,8	1,26	2,47	20
Linfocitos supresores/citotóxicos	39,0	1,37	3,28	20
Proporción de colaboradores/supresores	1,2	0,06	4,80	20
Linfocitos T activados	11,8	1,56	14,09	20
Linfocitos citolíticos naturales	16,8	1,28	6,93	20

a. La media es la media combinada, $\bar{Y}$ = la media de las medias individuales.

b. DE = desviación estándar, la desviación estándar combinada.

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2 + \ldots + (n_k - 1) \times s_k^2}{n_1 + n_2 + \ldots + n_k - k}}$$

s_i^2 = variación de la muestra i para $1 \leq i \leq k$.

k = número de muestras.

n = número de observaciones en una muestra.

c. CV = coeficiente de variación = $\frac{DE}{\bar{Y}} \times 100$

d. df = grado de libertad = (número de réplicas – número de medios de donantes) x número de sujetos; 4 alícuotas – 1 media = 3 grados de libertad. Tres grados de libertad para 5 sujetos = 15 grados de libertad, o 1 alícuota x 3 instrumentos – 1 media = 2 grados de libertad. Dos grados de libertad para 10 sujetos = 20 grados de libertad.

Estabilidad de las preparaciones celulares teñidas

Las preparaciones celulares de cinco sujetos normales se adquirieron y analizaron en BD FACScan™. Las preparaciones se conservaron a una temperatura de 2–8 °C en un lugar oscuro durante 24 horas, y se repitió el análisis mediante citometría de flujo. Los estudios no indicaron una diferencia significativa entre las lecturas del día 0 y del día 1 en ningún parámetro. Se recomienda analizar las muestras teñidas en las 24 horas siguientes.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

Tabla 7 Comparación de BD Simultest™ IMK Plus frente al método comparativo con LWB y BD FACScan™

Parámetro	Pendiente	Intersección	r	n[a]	Intervalo de datos (%)
Linfocitos T totales[b]	0,98	4,06	0,98	58	10–90
Linfocitos B totales[c]	0,97	1,47	0,99	65	0–80
Linfocitos colaboradores/inductores	1,16	–1,81	0,96	31	10–60
Linfocitos supresores/citotóxicos[d]	0,96	7,05	0,93	31	25–80
Proporción de colaboradores/supresores[d]	1,02	–0,02	0,98	31	0,125–2,0
Linfocitos T activados	1,06	0,34	0,92	27	5–50

a. Compuesto por muestras normales y anómalas.

b. Definido por CD3 FITC.

c. Definido por CD19 PE.

d. En comparación con BD Simultest™ Immune Monitoring Kit.

Reactividad cruzada

La especificidad de los anticuerpos monoclonales con un número de CD ha sido establecida mediante análisis ciego en diversos laboratorios por el International Leucocyte Workshop Group.[25,27,34,38,42,64,65]

El anticuerpo CD4 reacciona con los monocitos, así como con los linfocitos.[47] El anticuerpo Anti–HLA-DR reacciona con los monocitos/macrófagos, así como con los linfocitos B.[14,19,57–60] El anticuerpo CD14 reacciona con los granulocitos, así como con los monocitos/macrófagos.[33] El anticuerpo CD16 reacciona débilmente con los neutrófilos.[20] Los granulocitos potencialmente interferentes deben eliminarse del recuento de linfocitos utilizando sus propiedades de dispersión de la luz.

Aunque el reactivo B está diseñado para detectar unión de anticuerpos inespecífica de antígenos, puede observarse una unión inespecífica debido al mal estado de las células con cualquier reactivo de anticuerpo. Puede deducirse la existencia de unión de anticuerpos inespecífica de antígenos si no se observa una demarcación clara entre las células negativas y las positivas en el gráfico de fluorescencia o si más del 5 % de los recuentos del control negativo aparecen fuera del cuadrante 3. Consulte Solución de problemas, sección 12, al final de estas instrucciones de uso si se observa una unión de anticuerpos inespecífica de antígenos.

Linealidad-recuperación

Se obtiene el valor cuantitativo de todos los lotes de reactivos BD Simultest™ IMK Plus respecto a las suspensiones celulares reales para proporcionar un rendimiento óptimo a $1,0 \times 10^6$ leucocitos/muestra. En una muestra LWB, el rango normal es de $3,5 \times 10^3$ a $9,8 \times 10^3$ leucocitos/µl. Se espera que los resultados sean lineales entre $3,5 \times 10^3$ y $9,8 \times 10^3$ leucocitos/µl.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

12. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible causa	Solución
Separación insuficiente entre las poblaciones fluorescentes positivas y negativas.	• Reducción de la fluorescencia debido a un voltaje de PMT o a una ganancia del amplificador incorrectos. • Reactivo de anticuerpo insuficiente.	1. Ejecutar el software AutoComp™ con BD Calibrite™ Beads. Deben cumplirse las especificaciones de intensidad en los canales de fluorescencia. 2. Comprobar la calibración de la pipeta, el volumen de reactivo añadido, y el volumen y la concentración de las células añadidas. Comprobar las condiciones de almacenamiento del reactivo.
Ausencia de demarcación entre los residuos y los grupos de linfocitos en el gráfico de puntos de dispersión de la luz.	• Presencia de exceso de plaquetas o de eritrocitos nucleados o no lisados. • Ganancia del amplificador mal ajustada. • Muestra no teñida en las 6 horas siguientes a la recogida. • Umbral de FSC ajustado en un nivel demasiado alto o demasiado bajo.	1. Volver a teñir una muestra nueva. Lavar las células a una velocidad más baja, como 100 *g*, durante 15 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C). 2. Ajustar la ganancia del amplificador de forma que el borde izquierdo del grupo de linfocitos comience aproximadamente en el canal 50 (escala de 256-canales). Esto es especialmente importante al ir de la configuración o compensación con el software AutoComp™ a las determinaciones de sangre completa. Consultar la guía del usuario o el manual del instrumento correspondiente. 3. Recoger una muestra nueva para teñir. 4. Ajustar el umbral de FSC de forma que haya aproximadamente 10 canales de residuos (escala de 256 canales).

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Página 188 de 196

Problema	Posible causa	Solución
Rendimiento de la tinción de anticuerpos inferior al óptimo.	• Muestra no teñida en las 6 horas siguientes a la recogida. • El área de selección de análisis seleccionada por el software incluía demasiados eventos que no son linfocitos. • Marcadores de fluorescencia mal definidos.	1. Recoger una muestra nueva para teñir. 2. Volver a procesar los datos con el software BD CONSORT™ 30, BD LYSYS™ II o BD Simulset™ y definir un área de selección manual. **Nota:** Un área de selección de linfocitos reducida podría dejar fuera a los linfocitos grandes; por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales y linfoblastos. Si es posible, volver a adquirir las muestras una vez optimizada la dispersión (ajuste los parámetros PMT de SSC, ganancia de amplificador de FSC y umbral de FSC para separar los grupos de linfocitos de los residuos). Consultar la guía del usuario del software correspondiente. 3. Volver a procesar los datos con el software BD CONSORT™ 30, BD LYSYS™ II o BD Simulset™ y definir marcadores de fluorescencia manuales.
El software no puede definir un área de selección de linfocitos aceptable.	La muestra es linfopénica. • Umbral de FSC ajustado en un nivel demasiado alto o demasiado bajo. • Ganancia del amplificador mal ajustada. • Muestra no teñida en las 6 horas siguientes a la recogida. • Ajuste del marcador del software inadecuado.	1. Concentrar las células mediante un método de gradiente de densidad o volver a adquirir una cantidad de eventos mayor con el software BD CONSORT™ 30 o BD LYSYS™ II. 2. Ajustar el umbral de FSC de forma que haya aproximadamente 10 canales de residuos (escala de 256 canales). 3. Ajustar la ganancia del amplificador de forma que el borde izquierdo del grupo de linfocitos comience aproximadamente en el canal 50 (escala de 256 canales). Esto es especialmente importante al ir de la configuración/compensación con el software AutoComp™ a las determinaciones de sangre completa. Consultar la guía del usuario correspondiente. 4. Recoger una muestra nueva para teñir. 5. Volver a adquirir los datos con el software BD CONSORT™ 30 o BD LYSYS™ II.
Células no teñidas de la muestra teñida traspasan el marcador definido con el tubo de control B hacia C4 o C1.	• Unión de anticuerpos inespecífica de antígenos debido a que la muestra contiene células muertas o dañadas. • Unión de anticuerpos inespecífica de antígenos debido a receptores Fc.	1. Recoger una muestra nueva para teñir. 2. Comprobar si hay una excesiva contaminación por monocitos, granulocitos o residuos en el área de selección de linfocitos.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

Problema	Posible causa	Solución
Tinción débil o irregular.	• Concentración celular excesiva en la etapa de tinción. • Reactivo insuficiente. • Células no analizadas en las 24 horas siguientes a la tinción. • Preparación incorrecta del medio (se ha omitido la azida sódica).	1. Comprobar y ajustar la concentración celular; repetir la tinción con una muestra nueva. 2. Repetir la tinción con la cantidad de reactivo adecuada. 3. Repetir la tinción con una muestra nueva; analizar rápidamente. 4. Usar azida sódica en el medio de tinción y en las etapas de lavado.
Pocas células o ninguna.	• Concentración celular demasiado baja. • Funcionamiento incorrecto del citómetro de flujo.	1. Volver a poner en suspensión una muestra nueva a una concentración más alta. Repetir la tinción y el análisis. 2. Seguir las instrucciones para la solución de problemas del instrumento.
Aumento de la autofluorescencia.	• Posible contaminación bacteriana de la PBS o la solución fijadora. • Preparación de muestra insuficiente.	1. Preparar una PBS nueva con agua grado reactivo y una solución fijadora nueva. Filtrar la PBS y la solución fijadora a través de un filtro de 0,2 µm. 2. Recoger una muestra nueva y teñirla.
Fluorescencia positiva débil.	Posible contaminación bacteriana de la PBS o la solución fijadora. Tampón o solución fijadora con pH inadecuado.	Preparar una PBS nueva con agua grado reactivo y una solución fijadora nueva con PBS que contenga azida sódica. Ajustarla en el pH apropiado. Filtrar a través de un filtro de 0,2 µm.

GARANTÍA

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

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

REFERENCIAS

1. Wolde-Mariam W, Peter J. Recent diagnostic advances in cellular immunology.*Diagnost Med*. 1984;7:25-32.
2. Henry C, Mishell B, Shiigi S. Hemolytic plaque assays. In: Mishell B, Shiigi S, eds.*Selected Methods in Cellular Immunology*. San Francisco: WH Freeman and Co; 1980:69-123.
3. Grabstein K, Chen Y. Cell-mediated cytolytic responses. In: Mishell B, Shiigi S, eds. *Selected Methods in Cellular Immunology*. San Francisco: WH Freeman and Co; 1980:124-137.
4. Wofsy L, Henry C, Kimura J, North J. Modification and use of antibodies to label cell surface antigens. In: Mishell B, Shiigi S, eds. *Selected Methods in Cellular Immunology*. San Francisco: WH Freeman and Co; 1980:287-304.
5. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

6. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newslett.* 1990;10:43-55.
7. Nicholson JKA, Jones BM. Immunophenotyping by flow cytometry: its use in HIV infection. *Labmedica.* 1989;6:21-26.
8. Landay AL, Muirhead KA. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopath.* 1989;52:48-60.
9. Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies.*Blut.* 1989;59:200-206.
10. Ohno T, Kanoh T, Suzuki T, et al. Comparative analysis of lymphocyte phenotypes between carriers of human immunodeficiency virus (HIV) and adult patients with primary immunodeficiency using two-color immunofluorescence flow cytometry. *Tohoku J Exp Med.* 1988;154:157-172.
11. Antel J, Bania M, Noronha A, Neely S. Defective suppressor cell function mediated by T8+ cell lines from patients with progressive multiple sclerosis. *J Immunol.* 1986;137:3436-3439.
12. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus. Correlation with clinical features.*Am J Med.* 1982;72:783-790.
13. Legendre C, Schiffrin A, Weitzner G, Colle E, Guttmann R. Two color flow cytometry analysis of activated T-lymphocyte subsets in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes.* 1988;37:792-795.
14. Tomkinson BE, Wagner DK, Nelson DL, Sullivan JL. Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection. *J Immunol.* 1987;139:3802-3807.
15. Bishop G, Hall B, Duggin G, Horvath J, Sheil A, Tiller D. Immunopathology of renal allograft rejection analyzed with monoclonal antibodies to mononuclear cell markers. *Kidney Internat.* 1986;29:708-717.
16. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol.* 1983;131:1789-1796.
17. Giorgi JV, Hultin LE. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clinical Immunology Newsletter.* 1990;10:55-61.
18. Gratama J, Naipal A, Oljans P, et al. T lymphocyte repopulation and differentiation after bone marrow transplantation. Early shifts in the ratio between T4+ and T8+ T lymphocytes correlate with the occurrence of acute graft-versus-host disease.*Blood.* 1984;63:1416-1423.
19. Stites DP, Casavant CH, McHugh TM, et al. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence. *Clin Immunol Immunopathol.* 1986;38:161-177.
20. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1986;136:4480-4486.
21. Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T, et al. A definition of natural killer cells. In: Ades EW, Lopez C, eds. *Natural Killer Cells and Host Defense.* Basel: Karger; 1989:1.
22. Aiuti F, Sirianni M, Mezzaroma I, et al. HIV-1 infection: epidemiological features and immunological alterations during the natural history of the disease. *Clin Immunol Immunopath.* 1989;50:S157-S165.
23. Jandl J. Blood and blood forming tissues. In: Jandl J, ed. *Blood Textbook of Hematology.* Boston, Mass: Little Brown and Company; 1987:1-48.
24. Beverley P. Production and use of monoclonal antibodies in transplantation immunology. In: Touraine J, Trager J, Betuel H, eds. *Transplantation and Clinical Immunology XI.* Amsterdam: Excerpta Medica; 1980:87-94.
25. Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PC, Cobbold S, et al, eds. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
26. Rowe D, Beverley P. Characterisation of breast cancer infiltrates using monoclonal antibodies to human leucocyte antigens. *Br J Cancer.* 1984;49:149-159.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

27. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the first international Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories: M2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. *Leucocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:82-108.
28. Dimitriu-Bona A, Burmester GR, Waters SJ, Winchester RJ. Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1983;130:145-152.
29. Herrmann F, Komischke B, Odenwald E, Ludwig WD. Use of monoclonal antibodies as a diagnostic tool in human leukemia. I. Acute myeloid leukemia and acute phase of chronic myeloid leukemia. *Blut*. 1983;47:157-163.
30. Schwinzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
31. Goyert S, Tesio L, Ashman L, et al. Report on the CD14 Cluster Workshop. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:789-794.
32. Bernstein ID, Self S. Joint report of the myeloid section of the Second International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human Myeloid and Hematopoietic Cells*. Vol 3. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:1-25.
33. Jayaram Y, Hogg N. Surface expression of CD14 molecules on human neutrophils. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:796-797.
34. Haynes BF. Summary of T-cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
35. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/inducer and T-cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med*. 1981;153:310-323.
36. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti–Leu-4 antibody. *J Immunol*. 1983;131:536-539.
37. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. Vol 1. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:259-288.
38. Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: Summary and Comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human B Lymphocytes*. Vol 2. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;3-43.
39. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood*. 1988;71:603-612.
40. Lanier LL, Federspiel N, Ruitenberg JJ, et al. The T-cell antigen receptor complex expressed on normal peripheral blood CD4-, CD8- T lymphocytes: A CD3-associated disulfide-linked γ chain heterodimer. *J Exp Med*. 1987;165:1076-1094.
41. Dorken B, Moller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD19. In: Knapp W, Dorken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1986:34-36.
42. Bernard A, Boumsell L, Hill C. Joint report of the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories: T2 protocol. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds.*Leucocyte Typing*. New York, NY: Springer-Verlag; 1984:25-60.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co-Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

43. Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD, et al. Thymus-dependent membrane antigens in man: inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to T_{H2} antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:544-548.
44. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. 1986;47:333-348.
45. Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312:763-767.
46. Kurrle R. Cluster report: CD3. In: Knapp W, Dörken B, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:290-293.
47. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Anti–Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol*. 1983;131:212-216.
48. Anderson P, Blue M-L, Morimoto C, Schlossman SF. Cross-linking of T3 (CD3) with T4 (CD4) enhances the proliferation of resting T lymphocytes. *J Immunol*. 1987;139:678-682.
49. Eichmann K, Jönsson J-I, Falk I, Emmrich F. Effective activation of resting mouse T lymphocytes by cross-linking submitogenic concentrations of the T cell antigen receptor with either Lyt-2 or L3T4.*Eur J Immunol*. 1987;17:643-650.
50. Gallagher PF, Fazekas de St. Groth B, Miller JFAP. CD4 and CD8 molecules can physically associate with the same T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 1989;86:10044-10048.
51. Rudd CE, Burgess KE, Barber EK, Schlossman SF. Monoclonal antibodies to the CD4 and CD8 antigens precipitate variable amounts of CD4/CD8-associated $p56^{lck}$ activity. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:326-327.
52. Terry LA, Disanto JP, Small TN, Flomenberg N. Differential expression of the CD8 and Lyt-3 antigens on a subset of human T-cell receptor g/d-bearing lymphocytes. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:345-346.
53. Moebius U. Cluster report: CD8. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-343.
54. Lampson LA, Levy R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol*. 1980;125:293-299.
55. Brodsky FM. A matrix approach to human class II histocompatibility antigens: reactions of four monoclonal antibodies with the products of nine haplotypes.*Immunogenetics*. 1984;19:179-194.
56. Robbins P, Evans E, Ding A, Warner N, Brodsky F. Monoclonal antibodies that distinguish between Class II antigens (HLA-DP, DQ, and DR) in 14 haplotypes. *Hum Immunol*. 1987;18:301-313.
57. Terstappen LW, Hollander Z, Meiners H, Loken MR. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leuk Biol*. 1990;48:138-148.
58. Warnke RA, Levy R. Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method.*J Histochem Cytochem*. 1980;28:771-776.
59. Engleman EG, Warnke R, Fox RI, Dilley J, Benike CJ, Levy R. Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:1791-1795.
60. Edwards JA, Durant BM, Jones DB, Evans PR, Smith JL. Differential expression of HLA class II antigens in fetal human spleen: relationship of HLA-DP, DQ, and DR to immunoglobulin expression. *J Immunol*. 1986;137:490-497.
61. Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1.*J Immunol*. 1983;130:2133-2141.
62. Perussia B, Acuto O, Terhorst C, et al. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane.*J Immunol*. 1983;130:2142-2148.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

63. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A, et al. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies.*J Immunol.* 1984;133:180-189.
64. Schmidt RE. Non-lineage/natural killer section report: new and previously defined clusters. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:517-574.
65. Schubert J, Lanier LL, Schmidt RE. Cluster report: CD56. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds.*Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.
66. Knapp W, Rieber P, Dörken B, Schmidt R, Stein H, van dem Borne A. Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. *Immunol Today.* 1989;10:253-258.
67. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of the Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med.* 1989;169:2233-2238.
68. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. CLSI document M29-A4.
69. Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html. Accessed March 12, 2019.
70. *Collection of Diagnostic Venous Blood Specimens: Approved Standard—Seventh Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. CLSI document GP41-Ed7.
71. Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopath.* 1991;60:190-208.
72. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol.* 1985;3:33-37.

PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

Para conocer las patentes de EE. UU. que pueden aplicarse, consulte bd.com/patents.

BD, el logotipo de BD, BD CONSORT, BD FACSFlow, BD LYSYS, BD Simulset, Calibrite, FACScan, Leucogate, Simultest y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company o de sus empresas afiliadas. Las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios. © 2023 BD. Todos los derechos reservados.

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
CoDirector Técnico - Apoderado

Glosario de símbolos

Remítase al etiquetado del producto para consultar los símbolos aplicables.

Símbolo	Significado
	Fabricante
EC REP	Representante autorizado en la Unión Europea
CH REP	Representante autorizado en Suiza
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
SN	Número de serie
STERILE	Estéril
STERILE A	Esterilizado utilizando técnicas de procesado asépticas
STERILE EO	Esterilizado utilizando óxido de etileno
STERILE R	Esterilizado utilizando radiación
STERILE	Esterilizado utilizando vapor de agua o calor seco
	No volver a esterilizar
NON STERILE	No estéril
	No utilizar si el envase está dañado y consúltense las *instrucciones de uso*
STERILE	Vía fluida estéril
STERILE EO	Vía fluida estéril (óxido de etileno)
STERILE R	Vía fluida estéril (irradiación)
	Frágil, manejar con cuidado
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Manténgase seco
	Límite inferior de temperatura
	Límite superior de temperatura
	Límite de temperatura
%	Limitación de humedad
	Riesgos biológicos
	No reutilizar
	Consúltense las *instrucciones de uso* o consúltense las *instrucciones de uso* electrónicas
	Precaución
LATEX	Contenido o presencia de látex de caucho natural
IVD	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
CONTROL -	Control negativo
CONTROL +	Control positivo
Σ	Contenido suficiente para <*n*> pruebas
	Sólo para la evaluación del funcionamiento en diagnóstico in vitro
	Apirógeno
#	Número de paciente
	Este lado hacia arriba
	No apilar

Símbolo	Significado
	Sistema de barrera estéril única
PHT DEHP BBP	Contenido o presencia de ftalato: combinación de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y butilbenciftalato (BBP)
	Recoger por separado Indica la recogida por separado obligatoria de los residuos de aparatos eléctricos y electrónicos.
CE	Marcado CE; significa que cumple con la especificación técnica europea
	Prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente
	Producto para autodiagnóstico
Rx Only	Esto solo se aplica a EE. UU.: «Precaución: La ley federal estadounidense impone restricciones sobre este dispositivo, cuya venta debe ser realizada por un médico o por orden de este».
CC	País de fabricación «CC» debe sustituirse por el código de país de dos o tres letras.
	Hora de recogida
	Cortar
	Despegar por aquí
	Fecha de recogida
	Manténgase fuera de la luz
H_2	Se produce gas de hidrógeno
	Perforación
	Número de secuencia del panel de inicio
	Número de secuencia del panel final
	Número de secuencia interno
/	<n.º de envase>/<total de envases>
MD	Producto sanitario
	Contiene sustancias peligrosas
	Marca de conformidad ucraniana
FC	Cumple los requisitos de la FCC conforme a 21 CFR, parte 15
c UL us	Certificación de producto UL para EE. UU. y Canadá
UDI	Identificador único de dispositivo
	Importador
	Colocar la etiqueta del paciente únicamente en el área enmarcada
MR	Compatible con la resonancia magnética (RM)
MR	Compatibilidad condicional con la resonancia magnética (RM)
MR	Incompatible con la resonancia magnética (RM)
For use with	Para uso con
This Product Contains Dry Natural Rubber	Este producto contiene goma natural seca
For Export Only	Solo para exportación
Instruments	Instrumentos

Nota: La disposición del texto en los símbolos viene determinada por el diseño de la etiqueta.

L006715(08) 2023-03

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Gerente Técnico - Apoderado

IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
155 North McCarthy Boulevard
Milpitas, California 95035 USA

Australian and New Zealand Distributors:

Becton Dickinson Pty Ltd.
66 Waterloo Road
Macquarie Park NSW 2113
Australia

Becton Dickinson Limited
14B George Bourke Drive
Mt. Wellington Auckland 1060
New Zealand

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite bdbiosciences.com.

ClinicalApplications@bd.com

eifu.bd.com

HISTORIAL

Revisión	Fecha	Cambios realizados
23-23280(02)	2023-08	Se ha actualizado la dirección legal del fabricante. Se ha actualizado el glosario de símbolos. Se ha añadido la sección «Historial». Se ha actualizado la sección «Patentes y marcas comerciales». Se han eliminado las referencias a CellWASH. Se ha actualizado la tabla de la sección «Precauciones».

ESTEBAN ZORZOLI
Farmacéutico - M.N. 15643
Co Director Técnico - Apoderado

República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número: IF-2024-69608764-APN-INPM#ANMAT

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Miércoles 3 de Julio de 2024

Referencia: Rotulo y Manual de Instrucciones PM-634-4693

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 196 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.07.03 11:44:01 -03:00

Lorena Terrizzano
Director Nacional
Instituto Nacional de Productos Médicos
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.07.03 11:44:06 -03:00