

# ALOT

## Acute Leukemia Orientation Tube

Pacific Blue™	OC515	FITC	PE	PerCP-Cyanine 5.5	PE-Cyanine7	APC	APC-C750
CyCD3	CD45	CyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CD7	SmCD3

Ref: CYT-ALOT



*Para Diagnóstico In Vitro*

### LOS VIALES DE ALOT SON UN PRODUCTO LIOFILIZADO. LEA ATENTAMENTE LAS SIGUIENTES INSTRUCCIONES PARA SU RECONSTITUCIÓN:

El formato liofilizado del kit ALOT mantiene la estabilidad de la mezcla de anticuerpos que lo componen. Se recomienda reconstituir cada vial del reactivo que contiene la mezcla liofilizada de anticuerpos de superficie o citoplasmáticos con agua destilada hasta que el contenido esté disuelto:

- **Cada vial de mezcla de anticuerpos contra antígenos de membrana se reconstituye con 180 µl de agua destilada.**
- **Cada vial de mezcla de anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos se reconstituye con 105 µl de agua destilada.**

El volumen que no se utilice es estable durante un mes desde la fecha de reconstitución si se almacena a 2-8°C protegido de la luz.

### USO PROPUESTO

El tubo de orientación de leucemia aguda (ALOT, Acute Leukemia Orientation Tube) es un kit que contiene una mezcla de 8 anticuerpos diseñado para la evaluación inicial de poblaciones inmaduras de células hematopoyéticas en muestras biológicas con sospecha de leucemia aguda (línea linfóide B o T, no linfóide o fenotipo mixto) y su orientación posterior al panel de anticuerpos correspondiente BCP-ALL, T-ALL o AML/MSD. El tubo ALOT está diseñado a partir del tubo ALOT de EuroFlow<sup>(1)</sup>. Este reactivo debe ser utilizado por personal cualificado en citometría de flujo.

### INTRODUCCIÓN

La citometría de flujo es una herramienta importante en la caracterización analítica y cuantitativa de células ya que proporciona un análisis multiparamétrico de forma rápida y cuantitativa de poblaciones celulares heterogéneas basándose en un sistema célula a célula. La citometría de flujo emplea células en suspensión líquida que han sido incubadas con anticuerpos marcados con fluorocromos dirigidos hacia proteínas celulares específicas. La intensidad de fluorescencia relativa de las células positivas indica la cantidad de anticuerpo unido a sitios de unión específica en las células y, por tanto, proporciona una medida relativa de la expresión del antígeno.

Las leucemias agudas comprenden un grupo heterogéneo de neoplasias hematológicas caracterizadas por la expansión clonal de precursores hematopoyéticos inmaduros. Las clasificaciones internacionales actuales de leucemias agudas se fundamentan principalmente en la naturaleza del linaje de los blastos y las alternaciones citogenéticas y moleculares. Se reconocen dos categorías fundamentales: neoplasmas de precursores linfoides (que se subdividen en leucemias/linfomas de precursores linfoides B -LLA-B- y precursores linfoides T -LLA-T-) (2-5) y leucemias mieloides agudas (LMA) (6) y otros neoplasmas relacionados con los precursores mieloides (7).

El kit ALOT reconoce mediante citometría de flujo los antígenos CD45, CyCD3, SmCD3, CD7, CD34, CD19, CyCD79a y CyMPO, presentes en las diferentes poblaciones de precursores hematopoyéticos.

### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La citometría de flujo (FC) es una técnica mediante la cual se analizan de forma simultánea diferentes características celulares. Las células pasan alineadas una a una por delante de un conjunto de detectores luminosos y al mismo tiempo son iluminadas por un haz de láser. La interacción de las células con el haz de láser genera señales de dos tipos diferentes: las generadas por la luz dispersada (FSC/SSC), que reflejan principalmente el tamaño celular y su complejidad, y las relacionadas con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en las células. Estas señales se convierten en pulsos eléctricos que son amplificados y registrados como señales digitales para ser analizados por un ordenador.

Cuando se añade el reactivo a la muestra, los anticuerpos marcados con fluorocromo presentes en el reactivo se unen específicamente a los antígenos hacia los que están dirigidos y permiten la detección por CF de diferentes subpoblaciones linfocitarias.

La población de eritrocitos, que podría dificultar la detección de la población diana, se elimina mediante una solución de lisis de células rojas antes de la adquisición en el citómetro de la muestra.

## COMPOSICIÓN DEL REACTIVO

El kit ALOT contiene suficiente volumen para 25 determinaciones distribuido en viales liofilizados de 5 determinaciones cada uno. El kit ALOT incluye las combinaciones de anticuerpos contra antígenos de superficie y citoplasmáticos que se describe a continuación:

5 viales de 5 test cada uno con la siguiente mezcla liofilizada de anticuerpos para marcaje de superficie:

- Anticuerpo anti CD45-OC515 Humano, clon: GA90, isotipo: IgG2a.
- Anticuerpo anti CD34-PerCP-Cyanine 5,5 Humano, clon: 581, isotipo: IgG1.
- Anticuerpo anti CD19-PE-Cyanine7 Humano, clon: 19-1, isotipo: IgG1.
- Anticuerpo anti CD7-APC Humano, clon: HULY-M2, isotipo: IgG2a.
- Anticuerpo anti SmCD3-APC-C750 Humano, clon: UCHT-1, isotipo: IgG1.

5 viales de 5 test cada uno con la siguiente mezcla liofilizada de anticuerpos para marcaje citoplasmático:

- Anticuerpo anti CyCD3-Pacific Blue™ Humano, clon: UCHT-1, isotipo: IgG1.
- Anticuerpo anti CyMPO-FITC Humano, clon: 2C7, isotipo: IgG1.
- Anticuerpo anti CyCD79a-PE Humano, clon: HM57, isotipo: IgG1.

Fluorocromo	Pacific Blue™	OC515	FITC	PE	PerCP-Cyanine5.5	PE-Cyanine7	APC	APC-C750
Anticuerpo	CyCD3	CD45	CyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CD7	SmCD3
Clon	UCHT-1	GA90	2C7	HM57	581	19-1	HULY-M2	UCHT-1
Isotipo	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG1
Reactividad	Células T	Leucocitos	Cel. mieloides	Células B	Precusores	Células B	Células T	Células T

Todos los componentes contienen <0.1% (p/v) de azida sódica (NaN<sub>3</sub>). Los reactivos no son considerados estériles.

## CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El kit de ALOT es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, en condiciones de almacenamiento de 2-8°C. La fecha de caducidad se refiere al producto liofilizado. Después de la reconstitución, los viales con la combinación premezclada son estables durante un mes si se almacenan a 2-8°C protegidos de la luz.

Los componentes no deben ser congelados o expuestos a luz directa durante el almacenamiento o durante la incubación con células. Mantener los viales secos. Una vez abiertos, los viales deben ser almacenados en una posición vertical para evitar posible derrames.

## RECONSTITUCIÓN:

El kit ALOT liofilizado mantiene la estabilidad de la mezcla de anticuerpos. Reconstituir cada vial liofilizado que contiene las combinaciones premezcladas con agua destilada hasta que el liofilizado quede completamente disuelto.

- Cada vial de mezcla de anticuerpos contra antígenos de membrana se reconstituye con 180 µl de agua destilada.
- Cada vial de mezcla de anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos se reconstituye con 105 µl de agua destilada.

El volumen que no se utilice es estable durante un mes desde la fecha de reconstitución si se almacena a 2-8°C protegido de la luz.

## ADVERTENCIAS Y RECOMENDACIONES

1. Para uso en diagnóstico *in vitro*
2. Si se alteran los componentes de este kit por adición de otros componentes, estos cambios deben ser validados por el usuario.
3. El kit es estable durante el periodo de tiempo indicado en la fecha de caducidad cuando se almacena apropiadamente. No debe utilizarse después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Si se almacena en condiciones diferentes a las especificadas, tales condiciones deben ser validadas por el usuario.
4. Alteraciones en la apariencia de los componentes, como la presencia de precipitados o cambios de color, son indicativos de inestabilidad o deterioro. En esas condiciones el kit no debe ser utilizado.
5. Contiene <0.1% (p/v) de azida sódica (CAS-Nr. 26628-22-8) como conservante, pero aun así se debe tener cuidado para evitar la contaminación bacteriana del reactivo puesto que en esas circunstancias podrían obtenerse resultados incorrectos.
  - La azida sódica es tóxica si se ingiere (R22). En caso de ingestión, acudir inmediatamente al médico y mostrar esta información (S46).
  - Se debe usar ropa protectora adecuada (S36).
  - Al entrar en contacto con ácidos libera un gas tóxico (R32).
  - Los compuestos de azida deben desecharse con grandes cantidades de agua para evitar la formación de acumulaciones en cañerías de metal donde podrían darse condiciones para una explosión.
6. Todas las muestras biológicas y los materiales con los que estén en contacto deben considerarse como riesgos biológicos. Se recomienda su manipulación como sustancias capaces de transmitir infecciones <sup>(7)</sup> y desecharse con las precauciones reglamentarias establecidas para este tipo de productos. Se recomienda la manipulación del producto con ropa y guantes protectores apropiados y su uso por personal suficientemente cualificado para las técnicas descritas. Evitar el contacto de las muestras con la piel y las membranas mucosas. En caso de contacto con la piel, lavar inmediatamente con abundante agua.
7. La utilización de los reactivos usando tiempos de incubación o temperaturas diferentes a las recomendadas puede provocar resultados erróneos. Cualquiera de estos cambios debe ser validado por el usuario.
8. Cualquier incidente grave relacionado con el producto debe comunicarse a Cytognos así como a la autoridad componente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario.

## PROCEDIMIENTO

### Material suministrado

El kit ALOT tiene contenido suficiente para 25 determinaciones. El kit incluye los siguientes componentes:

- **5 viales liofilizados** con una mezcla de 5 anticuerpos conjugados con fluorocromos para marcaje de superficie.
- **5 viales liofilizados** con una mezcla de 3 anticuerpos conjugados con fluorocromos para marcaje citoplasmático.
- **Kit Fix&Perm®** (kit de fijación y permeabilización para marcaje citoplasmático; Nordic-MUBio BV, The Netherlands) con volumen suficiente para 25 test.
- **3 viales de compensación** de 5 test cada uno para los conjugados CD45-OC515, CD19-PE-Cyanine7 y SmCD3-APC-C750. Estos viales de compensación están en formato líquido listos para ser usados (5  $\mu$ l/test). Los requerimientos de compensación del OC515, PE-Cyanine7 y APC-C750 son similares a Pacific Orange™, PECy7 y APC-H7 respectivamente.

### Material requerido pero no suministrado

- Tubos de ensayo adecuados para la adquisición de las muestras en el citómetro de flujo utilizado. Habitualmente se utilizan tubos con fondo redondo de 6 ml, 12x 75 mm.
- Tubos de 10 ml para el lavado previo de la muestra.
- Pipeta automática (100  $\mu$ l) y puntas.
- Micropipeta con puntas.
- Agitador Vortex.
- Cronómetro.
- Centrífuga.
- Pipetas Pasteur o sistema de vacío.
- Agua destilada.
- Control isotópico negativo.
- Solución lisante de eritrocitos.
- Tampón fosfato (PBS) con albúmina sérica bovina (BSA) al 0,5% (p/v) y azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) -0,1% (p/v).

### Preparación

La obtención de muestra se debe hacer de forma aséptica por punción <sup>(10)</sup> en un tubo estéril de recolección que contenga un anticoagulante apropiado (se recomienda el uso de EDTA). Almacenar las muestras sanguíneas entre 18-22°C hasta su procesamiento. Se recomienda procesar las muestras de sangre dentro de las 24 horas siguientes a su extracción. No deben utilizarse muestras hemolizadas o con agregados celulares en suspensión.

1. Pipetear 50  $\mu$ l de la muestra a estudio en un tubo de análisis y añadir 30  $\mu$ l de vial reconstituido para marcaje de membrana (cóctel premezclado con los anticuerpos CD45-OC515/CD19-PE-Cyanine7/CD7-APC/CD34-PerCP-Cyanine5.5/SmCD3-APC-C750). Si es necesario, añadir PBS + 0,09% (p/v) de  $\text{NaN}_3$  + 0,5% (p/v) de BSA para alcanzar un volumen final de 100  $\mu$ l por tubo.
2. Mezclar bien.
3. Incubar 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
4. Lavar la muestra añadiendo 2 ml de PBS + 0,09% (p/v) de  $\text{NaN}_3$  + 0,5% (p/v) de BSA al precipitado celular.
5. Mezclar bien.
6. Centrifugar durante 5 minutos a 540 g.
7. Retirar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o sistema de vacío manteniendo intacto el precipitado celular, dejando un volumen residual aproximado de 50  $\mu$ l en cada tubo.
8. Resuspender el precipitado celular agitando suavemente.
9. Añadir 100  $\mu$ l de Reactivo A (solución de fijación; Fix&Perm™, Nordic-MUBio BV, The Netherlands).
10. Incubar 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
11. Añadir 2 ml de PBS + 0,09% (p/v) de  $\text{NaN}_3$  + 0,5% (p/v) de BSA al precipitado celular.
12. Mezclar bien.
13. Centrifugar durante 5 minutos a 540 g.
14. Retirar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o sistema de vacío manteniendo intacto el precipitado celular, dejando un volumen residual aproximado de 50  $\mu$ l en cada tubo.
15. Resuspender el precipitado celular agitando suavemente.
16. Añadir 100  $\mu$ l de Reactivo B (solución de permeabilización; Fix&Perm™, Nordic-MUBio BV, The Netherlands).
17. Mezclar bien.
18. Añadir 15  $\mu$ l de vial reconstituido para marcaje citoplasmático (cóctel premezclado con los anticuerpos CyCD3- Pacific Blue™ / CyMPO-FITC / CyCD79a-PE).
19. Mezclar bien.
20. Incubar 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
21. Añadir 2 ml de PBS + 0,09% (p/v) de  $\text{NaN}_3$  + 0,5% (p/v) de BSA al precipitado celular.
22. Mezclar bien.
23. Centrifugar durante 5 minutos a 540 g.
24. Retirar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o sistema de vacío manteniendo intacto el precipitado celular, dejando un volumen residual aproximado de 50  $\mu$ l en cada tubo.
25. Resuspender el precipitado celular con 200  $\mu$ l de PBS + 0,5% (p/v) de BSA (sin  $\text{NaN}_3$ ).
26. Adquirir directamente en el citómetro de flujo durante la primera hora tras finalizar la preparación de la muestra. Si las muestras no se adquieren inmediatamente después de la preparación, se deben almacenar en oscuridad a 4-8°C durante 1 hora como máximo.

Este es el procedimiento operativo estandarizado definido por EuroFlow para la preparación y el marcaje de muestras. Otros protocolos de marcaje deben ser validados para su aplicación en estos reactivos.

### Recomendaciones importantes:

Se recomienda seguir el procedimiento operativo de calibración definido por EuroFlow para ajustar las condiciones del citómetro <sup>(6)</sup>. Encontrará una guía completa (Cytometer Setup SOP) en la página web [www.euroflow.org](http://www.euroflow.org), que incluye recomendaciones para establecer la configuración del citómetro, ajustar los parámetros FCS y SSC, los voltajes de los fotomultiplicadores y la compensación, y monitorizar el funcionamiento del citómetro.

La adquisición de muestras marcadas con este kit requiere la selección de condiciones de compensación adecuadas. La mayoría de los fluorocromos emiten también en canales próximos, pero este solapamiento espectral puede ser corregido matemáticamente. Se utilizan tubos de marcaje simple para los ajustes de compensación. Para este propósito se incluye en el kit un vial de CD45-OC515 (población diana positiva: linfocitos), otro de CD19-PE-Cyanine7 (población diana positiva: Células B) y otro de SmCD3-APC-C750 (población diana positiva: linfocitos T). Se recomienda usar 5 µl de cada uno de los reactivos para la preparación de los tubos con marcaje simple.

### Análisis por citometría de flujo

Cytognos recomienda el uso del software de análisis Infinicyt™, que es capaz de guardar patrones de expresión conocidos (Imagen de Referencia) y almacenar estrategias de análisis para ser aplicadas en serie a otras muestras utilizando siempre el mismo criterio. Encontrará información completa sobre Infinicyt™ en la página web: [www.infinicyt.com](http://www.infinicyt.com).

Se recomienda seguir las siguientes indicaciones para el análisis de los archivos de muestras marcadas con el kit ALOT: primero se deben seleccionar los blastos mediante el patrón de expresión característico de CD34 y CD45; a continuación se seleccionarán el resto de las poblaciones celulares con ayuda de los marcadores específicos de línea (CyMPO para línea mieloide; CyCD3, SmCD3 y CD7 para línea linfocítica; CD19 y CyCD79a para línea linfocítica B).

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### Especificidad

- El antígeno CD45 se expresa en leucocitos humanos incluyendo linfocitos, monocitos, granulocitos y eosinófilos. Eritrocitos, plaquetas y células de origen no hematopoyético no expresan el antígeno CD45.
- El antígeno CD34 es un marcador característico de precursores hematopoyéticos; se expresa en los blastos de la mayoría de las leucemias agudas de cualquier línea.
- El antígeno CyCD3 se expresa en los primeros estadios de la maduración de células T.
- El antígeno SmCD3 se expresa en la superficie de timocitos maduros y de células T en sangre periférica.
- El antígeno CD7 es un marcador de línea T que también se expresa en un número significativo de leucemias mieloides agudas (LMA) <sup>(1)</sup>.
- El antígeno CD19 se expresa en la superficie de las células B tanto normales como neoplásicas desde estadios tempranos; es positivo en prácticamente todos los casos de leucemia linfoblástica de línea B (LLA-B).
- El antígeno CyCD79a es un marcador de línea B que también se expresa en algunas leucemias de diferentes líneas celulares, como leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfoblástica de línea T (LLA-T).
- El antígeno CyMPO es específico de linaje mieloide desde estadios tempranos de maduración.

### Valores esperados

Cada laboratorio debe establecer sus valores normales de referencia para las poblaciones linfocitarias, teniendo en cuenta que estos valores pueden variar dependiendo de la edad, el sexo o la raza. La siguiente tabla muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) esperada de los diferentes anticuerpos incluidos en el kit ALOT para cada población diana. Los datos corresponden a n = 23 muestras de donantes de sangre sanos medidas en un citómetro BD FACSCanto II y analizadas con el software Infinicyt™ (Cytognos S.L., Salamanca, España).

Anticuerpo	Fluorocromo	Población celular	Media (IMF) ± SD (rango)	CV (%)
CyMPO	FITC	SSC+/CD45+ neutrófilos	11938,29±2869,86 (7720,41-19352,06)	24,04
CD7	APC	CD45+/SSC low/ CD3+ células T	20371,16±3687,99 (10491,40-25454,79)	18,10
SmCD3	APC-C750	CD45+/SSC low/ CD3+ células T	13730,61±2653,86 (10126,29-19318,16)	19,33
CyCD3	Pacific Blue™	CD45+/SSC low/ CD3+ células T	8660,22±1690,10 (6007,08-11936,36)	19,52
CD45	OC515	leucocitos	5803,10±372,08 (4820,44-6435,38)	6,41
CyCD79a	PE	CD45+/SSC low/ CD19+ células B	4514,10±1183,59 (2383,69-6790,60)	26,22
CD19	PE-Cyanine7	CD45+/SSC low/ CD19+ células B	16983,91±1856,61 (14565,99-21108,34)	10,93
CD34	PerCP-Cyanine5.5	CD45dim/SSC low precursores hematopoyéticos (0,01%)	9246,18±1731,64 (6902,66-12789,01)	18,73

### Exactitud

La intensidad media de fluorescencia de las poblaciones mayoritarias analizadas con el kit de screening ALOT de Cytognos fueron comparadas con los resultados obtenidos con la combinación de anticuerpos propuesta por el Consorcio EuroFlow<sup>(1)</sup>. La comparación de las n=10 muestras procesadas con ambas combinaciones muestran que el kit ALOT puede ser considerado equivalente. Los datos fueron analizados con el software Infinicyt™.

Anticuerpo	Población de referencia	Media de la combinación control (%) ± SD (rango)	Media de ALOT Cytognos (%) ± SD (rango)	Diferencias en la media (%)	CV Control (%)	CV Cytognos (%)
CyMPO	SSC+/CD45+ neutrófilos	12722,72±3729,14 (9512,49 - 21725,32)	11760,06±2560,38 (8943,94 - 16898,67)	7,57	29,31	21,77
CD7	CD45+/SSC low/ CD3+ células T	24581,94±2735,69 (20115,92 - 29121,4)	21885,53±2250,11 (17555,1 - 25454,79)	10,97	11,13	10,28
SmCD3	CD45+/SSC low/ CD3+ células T	14283,53±1294,37 (13076,11-16616,83)	16179,96±1909,74 (13852,45 - 19318,16)	13,28	9,06	11,80
CyCD3	CD45+/SSC low/ CD3+ células T	6862,51±1196,53 (5377,81 - 9316,96)	9137,26±1664,22 (6548,12 - 11936,36)	33,15	17,44	18,21
CD45	leucocitos	5395,66±293,91 (5060,44 - 5854,68)	6012,47±254,70 (5662,71 - 6395,93)	11,43	5,45	4,24
CyCD79a	CD45+/SSC low/ CD19+ células B	5354,82±1054,08 (3740,11 - 7108,06)	4480,64±1144,20 (2613,53 - 6487,99)	16,33	19,68	25,54
CD19	CD45+/SSC low/ CD19+ células B	19112,52±2246,82 (15787,33-23072,07)	16855,14±1991,11 (14788,62 - 21108,34)	11,81	11,76	11,81
CD34	CD45dim/SSC low precursores hematopoyéticos (0,01%)	9967,59±1395,67 (7279,95 - 12474,82)	8866,51±1763,79 (6902,66 - 11549,16)	11,05	14,00	19,89

### Repetitividad

Se marcaron 10 muestras diferentes de sangre periférica de donantes sanos con dos lotes distintos del kit ALOT. Cada par de datos se analizó para evaluar las diferencias en IMF de los diferentes anticuerpos incluidos en el kit ALOT en ambos lotes. Los datos se analizaron con el software Infinicyt™.

Anticuerpo	Fluorocromo	Población celular	Lote	Media IMF	% Diferencias IMF	SD	CV (%)	p-valor
CyMPO	FITC	SSC+/CD45+ neutrófilos	1	11760,06	3,79	2560,38	21,77	0,280178
			2	12223,17		3457,15	28,28	
CD7	APC	CD45+/SSC low/ CD3+ células T	1	21885,53	3,58	2250,11	10,28	0,000574
			2	21128,19		2234,89	10,58	
SmCD3	APC-C750	CD45+/SSC low/ CD3+ células T	1	16179,96	34,59	1909,74	11,80	0,000001
			2	12021,56		1045,02	8,69	
cyCD3	Pacific Blue™	CD45+/SSC low/ CD3+ células T	1	9137,26	18,27	1664,22	18,21	0,000279
			2	7725,85		1396,02	18,07	
CD45	OC515	leucocitos	1	6012,47	6,49	254,70	4,24	0,000607
			2	5646,17		205,90	3,65	
CyCD79a	PE	CD45+/SSC low/ CD19+ células B	1	4480,64	3,56	1144,20	25,54	0,118369
			2	4326,51		1232,10	28,48	
CD19	PE-Cyanine7	CD45+/SSC low/ CD19+ células B	1	16855,14	2,87	1991,11	11,81	0,041229
			2	17353,80		1815,74	10,46	
CD34	PerCP-Cyanine5.5	CD45dim/SSC low precursores hematopoyéticos (0,01%)	1	8866,51	5,57	1763,79	19,89	0,192648
			2	9389,99		1824,02	19,43	

## LIMITACIONES

- Las muestras de sangre deben almacenarse a 18-22°C y procesarse dentro de las 24 horas siguientes a su recolección.
- Es recomendable adquirir en el citómetro las muestras teñidas lo antes posible para optimizar los resultados. Podrían marcarse de forma inespecífica células no viables. La exposición prolongada a reactivos líticos puede producir la degradación de los leucocitos y la pérdida de células de la población de interés.
- La presencia de glóbulos rojos nucleados y concentraciones anormales de proteína o hemoglobinopatías pueden dar lugar a la lisis incompleta de eritrocitos. Estas condiciones pueden dar lugar a recuentos celulares anormalmente bajos puesto que los eritrocitos no lisados pueden ser contados como linfocitos.
- Los resultados obtenidos por citometría de flujo pueden ser erróneos si el láser del citómetro no está perfectamente alineado o los "gates" no han sido ajustados adecuadamente.
- Cada laboratorio debe establecer su propio rango de normalidad de las subpoblaciones linfocitarias. Se recomienda seguir los paneles de anticuerpos definidos por EuroFlow<sup>(1)</sup> junto con los procedimientos operativos de calidad para el ajuste del citómetro y la preparación y análisis de la muestra a estudio<sup>(6)</sup>.
- Las muestras celulares resultantes de la separación por gradiente de densidad pueden no tener la misma concentración relativa que la muestra de origen. Las diferencias pueden ser relativamente insignificantes en muestras de individuos con recuentos sanguíneos normales. En pacientes leucopénicos, la pérdida selectiva de subpoblaciones específicas pueden afectar a la exactitud de la determinación.
- Es importante comprender el patrón normal de expresión de estos antígenos y su relación con la expresión de otros antígenos relevantes con el fin de realizar un análisis adecuado<sup>(1-5,10,11)</sup>.

## CONTROL DE CALIDAD

- Para obtener resultados óptimos se recomienda verificar la precisión de las pipetas y que el citómetro está correctamente calibrado.
- La fabricación de este producto sigue las normas de producción y los sistemas de calidad en conformidad con la norma ISO 13485:2012.









## BIBLIOGRAFÍA

- van Dongen JJM, L'hermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lécresse Q, Lucio P, Mejstrikova E, Szczepański T, Kalina T, de Tute R, Brüggemann M, Sedek L, Cullen M, Langerak AW, Mendonca A, Macintyre E, Martin-Ayuso M, Hrusak O, Vidrales MB and Orfao A, On behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 2012, 26(9):1908-1975.
- Borowitz MJ, Chan JKC. B lymphoblastic leukemia/lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (eds). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4<sup>th</sup> ed. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2008, 168-175.
- Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, Braylan R. 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72 Suppl 1: S3.
- Van den Ancker W, Terwijn M, Westers TM, Merle PA, van Beckhoven E, Drager AM et al. Acute leukemias of ambiguous lineage: diagnostic consequences of the WHO 2008 classification. *Leukemia* 2010; 24(7): 1392-1396.
- Matutes E, Pickl WF, Van't Veer M, Morilla R, Swansbury J, Strobl H et al. Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. *Blood* 2011; 117(11): 3163-3171.
- Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry A* 2004; 58(1): 62-71.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (eds). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4<sup>th</sup> ed. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2008, 439.
- Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometry instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, 2012; 26(9):1986-2010.
- Protection of Laboratory Workers from occupationally acquired infections. 2nd edition; approved guideline (2001). Villanova PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document M29-A2.
- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture- approved standard; 5th edition (2003). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H3-A5.

## GARANTÍA

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

## EXPLICACIÓN DE SÍMBOLOS

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

## PRODUCIDO POR

CYTOGNOS S.L.

Polígono La Serna, Nave 9  
37900 Santa Marta de Tormes  
Salamanca (España)

Teléfono: + 34-923-125067

Fax: + 34-923-125128

Información de pedidos: [admin@cytognos.com](mailto:admin@cytognos.com)

Información técnica: [support@cytognos.com](mailto:support@cytognos.com)

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

Los anticuerpos conjugados con Pacific Blue™ se comercializan bajo un acuerdo entre Molecular Probes Inc. (subsidiaria en propiedad de Invitrogen Corporation) y Cytognos S.L, y la fabricación, uso, venta o importación de Pacific Blue™ pueden estar sometidas a una o más patentes propiedad de Molecular Probes Inc. Para información sobre compra de licencia del Pacific Blue™ contacte con Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402, USA, Tel: (541) 465-8300. Fax: (541) 335-0504.

Nordic-MUBio FIX&PERM® (Kit de Fijación y Permeabilización) es suministrado en cooperación con Nordic-MUBio BV, The Netherlands. FIX&PERM® es una marca registrada de Nordic-Mubio BV.