

# PCST

## Plasma Cell Screening Tube

Pacific Blue™	OC515	FITC	PE	PerCP-Cyanine 5.5	PE-Cyanine7	APC	APC-C750
CD45	CD138	CD38	CD56	β2micro	CD19	Cylgk	Cylgλ

Ref: CYT-PCST



Para Diagnóstico In Vitro

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

El formato liofilizado del kit PCST 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 70 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.

### FINALIDAD PREVISTA

El tubo para la evaluación de células plasmáticas (PCST, Plasma Cell Screening Tube) es un kit que contiene una mezcla de 8 anticuerpos diseñado para la identificación y enumeración de células plasmáticas, así como para la discriminación entre células plasmáticas normales policlonales (ej. plasmocitosis reactiva) y células plasmáticas aberrantes monoclonales (ej. gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), mieloma múltiple (MM) latente y sintomático, leucemia de células plasmáticas (LCP) y plasmocitoma extramedular). En combinación con el tubo de screening PCST (EuroFlow) y el panel de estudio de síndromes linfoproliferativos crónicos de línea B (panel B-CLPD) se pueden diagnosticar otras patologías de células plasmáticas como macroglobulinemia de Waldenström y linfoma linfoplasmocítico <sup>(1,2)</sup>. El tubo PCST está diseñado a partir del primer tubo del panel PCD (Plasma Cell Dyscrasias) de EuroFlow <sup>(3)</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.

Los desórdenes de células plasmáticas comprenden un grupo de enfermedades que se caracterizan frecuentemente por la presencia de células plasmáticas neoplásicas en la médula ósea que son capaces de secretar inmunoglobulinas clonales, las cuales pueden ser detectadas en orina y/o suero. Estos desórdenes comprende varias entidades entre las cuales el mieloma múltiple (MM) y la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) son las más prevalentes y representativas. También se incluyen en este grupo otras condiciones clínicas menos frecuentes asociadas con localizaciones extramedulares de células plasmáticas y fallos orgánicos debidos a la acumulación clonal de inmunoglobulinas (ej. amiloidosis) <sup>(4)</sup>.

El kit PCST reconoce mediante citometría de flujo los antígenos CD45, CD138, CD38, CD56, β2-microglobulina, CD19, Cylgk y Cylgλ, que permitan la evaluación e identificación de células plasmáticas normales y aberrantes (clonales).

El uso de paneles de 8 colores en citometría de flujo requiere el uso de nuevos fluorocromos que se describen a continuación:

- **Orange Cytognos 515 (OC515)** es un fluorocromo que se excita con el láser violeta (405 nm) y emite a 515 nm. Este fluorocromo proporciona una resolución máxima y picos de emisión estrechos, lo que tiene como resultado un solapamiento espectral muy pequeño y una necesidad de compensación mínima.
- **APC-C750** es un fluorocromo tándem que tiene un pico máximo de emisión a 779 nm, lo que garantiza una señal muy brillante, bajo ruido de fondo y una alta fotoestabilidad. Cuando es excitado por un láser rojo, el fluorocromo APC transfiere energía a la molécula C750, que emite a continuación a una longitud de onda más alta. Se recomienda usar un filtro de banda de 780/60 nm junto con un detector de láser rojo para usar con anticuerpos conjugados con APC y APC-C750.

## **PRINCIPIOS DEL ENSAYO**

La citometría de flujo 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 citometría de flujo 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.

Se recomienda seguir el protocolo "Calibration EuroFlow Standard Operating Protocol for Cytometer Setup" <sup>(6)</sup>. Se puede encontrar una guía completa (Cytometer Setup SOP) en la página web [www.euroflow.org](http://www.euroflow.org), que incluye recomendaciones para la configuración de instrumentos, el ajuste de FSC y SSC, el ajuste de los valores diana de los fotomultiplicadores, el ajuste de la compensación y la monitorización del funcionamiento del instrumento.

## **COMPOSICIÓN DEL REACTIVO**

El kit PCST contiene suficiente volumen para 25 determinaciones distribuido en viales liofilizados de 5 determinaciones cada uno. El kit PCST 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- Pacific Blue™ Humano, clon: GA90, isotipo: IgG2a.
- Anticuerpo anti CD138-OC515 Humano, clon: B-A38, isotipo: IgG1.
- Anticuerpo anti CD38-FITC Humano, clon: LD38, isotipo: IgG1.
- Anticuerpo anti CD56-PE Humano, clon: C5.9, isotipo: IgG2b.
- Anticuerpo anti β2-micro-PerCP-Cyanine5.5 Humano, clon: B2-1, isotipo: IgG2a.
- Anticuerpo anti CD19-PE-Cyanine7 Humano, clon: 19-1, isotipo: IgG1.

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

- Anticuerpo anti Cylgκ-APC Humano, policlonal.
- Anticuerpo anti Cylgλ-APC-C750 Humano, policlonal.

Fluorocromo	Pacific Blue™	OC515	FITC	PE	PerCP-Cyanine5.5	PE-Cyanine7	APC	APC-C750
Anticuerpo	CD45	CD138	CD38	CD56	β2-micro	CD19	Cylgκ	Cylgλ
Clon	GA90	B-A38	LD38	C5.9	B2-1	19-1	Policlonal	Policlonal
Isotipo	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG2b	IgG2a	IgG1		
Reactividad	Leucocitos	Células plasmáticas	Células plasmáticas	Células NK	Células plasmáticas	Células B	Células B / Células plasmáticas	Células B / Células plasmáticas

Todos los componentes contienen 0,09% (p/v) de azida sódica (NaN<sub>3</sub>). Los reactivos no son considerados estériles.

## CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El kit de PCST 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.

La vida útil del reactivo ha sido determinada mediante estudios de estabilidad durante el uso.

## RECONSTITUCIÓN:

El kit PCST 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 70 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 0,09% (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.

### **Indicaciones de peligro:**

H302 Nocivo en caso de ingestión

### **Indicaciones de prudencia:**

P264 Lavarse concienzudamente tras la manipulación.

P270 No comer, beber ni fumar durante su utilización.

P301+P312 En caso de ingestión, llamar a un centro de información toxicológica o a un médico en caso de malestar.

P301+P330 En caso de ingestión, enjuagarse la boca.

P501 Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con la normativa local, regional, nacional o internacional.

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 competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario.

## PROCEDIMIENTO

### **Material suministrado**

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

- **5 viales liofilizados** con una mezcla de 6 anticuerpos conjugados con fluorocromos para marcaje de superficie.

- **5 viales liofilizados** con una mezcla de 2 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 Cylgλ-APC-C750. Estos viales de compensación están en formato líquido listos para ser usados. 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

- Citómetro de flujo equipado con láser violeta de 405 nm, láser de ion argón de 488 nm, láser rojo de 633 nm, filtro de banda de 780/60 nm, ordenador y software asociado.
- Tubos de ensayo adecuados para la adquisición de las muestras en el citómetro de flujo utilizado. Habitualmente se utilizan tubos con fondo redondo de 6 ml, 12x 75 mm.
- Tubos de 10 ml para el lavado previo de la muestra.
- Pipeta automática (100 µl) y puntas.
- Micropipeta con puntas.
- Agitador Vortex.
- Cronómetro.
- Centrífuga.
- Pipetas Pasteur o sistema de vacío.
- Agua destilada.
- Control isotípico negativo.
- Solución lisante de eritrocitos.
- Tampón fosfato (PBS) con albúmina sérica bovina (BSA) al 0,5% (p/v) y azida sódica (NaN<sub>3</sub>) 0,09% (p/v).

#### Preparación

La obtención de la 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 µl de la muestra a estudio en un tubo de análisis y añadir 30 µl de vial reconstituido para marcaje de membrana (cóctel premezclado con los anticuerpos CD45-Pacific Blue™/CD19-PE-Cyanine7/CD138-OC515/CD38-FITC/CD56-PE/β2- micro-PerCP-Cyanine5.5). Si es necesario, añadir PBS + 0,09% (p/v) de NaN<sub>3</sub> + 0,5% (p/v) de BSA para alcanzar un volumen final de 100 µl 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% de NaN<sub>3</sub> + 0,5% (p/v) de BSA al precipitado celular.
5. Mezclar bien.
6. Centrifugar durante 5 minutos a 540 x 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 µl en cada tubo.
8. Resuspender el precipitado celular agitando suavemente.
9. Añadir 100 µl 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% de NaN<sub>3</sub> + 0,5% (p/v) de BSA al precipitado celular.
12. Mezclar bien.
13. Centrifugar durante 5 minutos a 540 x 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 µl en cada tubo.
15. Resuspender el precipitado celular agitando suavemente.
16. Añadir 100 µl de Reactivo B (solución de permeabilización; Fix&Perm™, Nordic-MUBio BV, The Netherlands).
17. Mezclar bien.
18. Añadir 10 µl de vial reconstituido para marcaje citoplasmático (cóctel premezclado con los anticuerpos Cylgκ-APC / Cylgλ-APC-C750).
19. Mezclar bien.
20. Incubar 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

21. Añadir 2 ml de PBS + 0,09% de NaN<sub>3</sub> + 0,5% (p/v) de BSA al precipitado celular.
22. Mezclar bien.
23. Centrifugar durante 5 minutos a 540 x 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 µl en cada tubo.
25. Resuspender el precipitado celular con 200 µl de PBS + 0,5% (p/v) de BSA (sin NaN<sub>3</sub>).
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<sup>o</sup>-8<sup>o</sup>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 CyIgλ-APC-C750 (población diana positiva: células B Lambda+). 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).

### EFICACIA ANALÍTICA

#### 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.
- Los antígenos CD38 y CD138 permiten una identificación eficiente de las células plasmáticas y distinguir entre los compartimentos normal (reactivo) y aberrante (clonal) en función de sus fenotipos más frecuentes.
- El antígeno CD19 se expresa en la superficie de las células B tanto normales como neoplásicas y no se expresa ni en células T, ni en monocitos ni en granulocitos.
- El antígeno β2-microglobulina reconoce la cadena β, la cual se une de forma no covalente con la cadena α para formar el complejo mayor de histocompatibilidad HLA Clase I. Se ha observado que la expresión de β2-microglobulina en la membrana de las células plasmáticas está correlacionada negativamente con los niveles de β2-microglobulina en suero y con un mejor pronóstico, lo que la convierte en un marcador pronóstico de interés.
- El antígeno CD56 se expresa en las células NK (activadas y en reposo) en sangre periférica y además en una subpoblación de células T CD3+.
- El anticuerpo citoplasmático anti-Cadenas Ligeras Kappa reacciona con las cadenas ligeras libres Kappa, así como con las cadenas Kappa de las moléculas de inmunoglobulina intactas.
- El anticuerpo citoplasmático anti-Cadenas Ligeras Lambda reacciona con las cadenas ligeras libres Lambda, así como con las cadenas Lambda de las moléculas de inmunoglobulina intactas.

### 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. Los rangos de referencia para las diferentes poblaciones linfocitarias se detallan en la siguiente tabla y son expresadas como un porcentaje de la población de linfocitos. Los datos corresponden a n = 10 muestras de médula ósea

procedentes de pacientes diagnosticados de mieloma múltiple marcadas con el kit PCST, adquiridas en un citómetro BD FACSCanto II y analizadas con el software Infinicyt™ (Cytognos S.L., Salamanca, España).

Población celular	Población de referencia	Media (%) $\pm$ SD (rango)	CV (%)
Linfocitos	leucocitos	11.31 $\pm$ 5.48 (5.26 - 21.49)	48.48
Células B	linfocitos	19.86 $\pm$ 15.01 (0.58 - 49.25)	75.57
Células B Kappa+	células B	44.42 $\pm$ 16.67 (12.72 - 63.67)	37.52
Células B Lambda+	células B	37.17 $\pm$ 13.68 (11.38 - 63.64)	36.81
Células NK	linfocitos	3.15 $\pm$ 2.64 (0.51 - 9.62)	83.6

La siguiente tabla muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) esperada de los diferentes anticuerpos incluidos en el kit PCST para cada población diana. Los datos corresponden a n = 10 muestras de médula ósea procedentes de pacientes diagnosticados de mieloma múltiple marcadas con el kit PCST, adquiridas en un citómetro BD FACSCanto II y analizadas con el software Infinicyt™.

Anticuerpo	Fluorocromo	Población celular	Media IMF $\pm$ SD (rango)	CV (%)
CD45	Pacific Blue™	CD45+/SSC <sub>low</sub> linfocitos	22371.18 $\pm$ 9611.37 (4384.24 - 41720.50)	42.96
CD138	OC515	Células plasmáticas	2375.27 $\pm$ 1474.74 (705.72 - 6366.52)	62.09
CD38	FITC	Células plasmáticas	13773.08 $\pm$ 10319.73 (1716.82 - 36305.62)	74.93
CD56	PE	CD56+/CD3-/CD19- células NK	2564.02 $\pm$ 962.82 (919.12 - 4442.38)	37.55
$\beta$ 2-microglobulina	PerCP-Cyanine5.5	$\beta$ 2micro+/CD45+/SSC <sub>low</sub> linfocitos	42419.22 $\pm$ 15880.95 (11031.63 - 66154.40)	37.44
CD19	PE-Cyanine7	CD19+ células B	8326.01 $\pm$ 2202.14 (3842.45-11524.31)	26.45
CyLambda	APC-C750	CD19+ células B	11707.30 $\pm$ 35036.82 (4148.39 - 30785.24)	68.62
CyKappa	APC	CD19+ células B	35408.78 $\pm$ 8033.45 (2937.65 - 107872.55)	98.95

### Exactitud

Los porcentajes obtenidos de las poblaciones linfocitarias mayoritarias con el kit de screening PCST de Cytognos fueron comparados con los resultados obtenidos con la combinación de anticuerpos propuesta por el Consorcio EuroFlow<sup>(3)</sup>. La comparación de las n=10 muestras de médula ósea procedentes de pacientes diagnosticados de mieloma múltiple procesadas con ambas combinaciones muestran que el kit PCST puede ser considerado equivalente. La siguiente tabla indica que los resultados en muestras de mieloma múltiple son equivalentes en términos de porcentajes de las diferentes poblaciones linfocitarias. Los datos fueron analizados con el software Infinicyt™.

Población celular	Población de referencia	Media de la combinación control (%) $\pm$ SD (rango)	Media de PCST Cytognos (%) $\pm$ SD (rango)	Diferencias en la media (%)	CV Control (%)	CV Cytognos (%)	p-valor
CD45	CD45+/SSC <sub>low</sub> linfocitos	9894.93 $\pm$ 1719.47 (6578.72 - 12053.27)	22371.18 $\pm$ 9611.37 (4384.24 - 41720.50)	126.09	17.38	42.96	0.000
CD138	Células plasmáticas	2154.10 $\pm$ 1445.25 (500.62 - 6366.52)	2375.27 $\pm$ 1474.74 (705.72-6366.52)	10.27	67.09	62.09	0.83
CD38	Células plasmáticas	16928.38 $\pm$ 11032.57 (1672.12 - 37856.57)	13773.08 $\pm$ 10319.73 (1716.82-36305.62)	18.64	65.17	74.93	0.005
CD56	CD56+/CD3-/CD19- células NK	2409.13 $\pm$ 632.46 (1544.82-3279.42)	2564.02 $\pm$ 962.82 (919.12-4442.38)	6.43	26.25	37.55	0.33
$\beta$ 2-microglobulina	$\beta$ 2micro+/CD45+/SSC <sub>low</sub> linfocitos	19124.88 $\pm$ 7279.99 (10158.59-30098.74)	42419.22 $\pm$ 15880.95 (11031.63-15880.95)	121.80	38.07	37.44	0.000
CD19	CD19+ células B	9658.61 $\pm$ 2174.34 (7025.29-13715.10)	8326.01 $\pm$ 2202.14 (3842.45-11524.31)	13.80	22.51	26.45	0.001
CyLambda	CD19+ células B	3518.94 $\pm$ 3062.26 (657.95-11472.50)	11707.30 $\pm$ 8033.45 (4148.39-30785.24)	232.69	87.02	68.62	0.01
CyKappa	CD19+ células B	14202.30 $\pm$ 9327.76 (2446.33-25766.41)	35408.78 $\pm$ 35036.82 (2937.65-107872.55)	149.32	65.68	98.95	0.002

## Repetitividad

Se marcaron 10 muestras de médula ósea procedentes de pacientes diagnosticados de mieloma múltiple con dos lotes distintos del kit PCST. Cada par de datos se analizó para evaluar las diferencias en IMF de los diferentes anticuerpos incluidos en el kit PCST en ambos lotes. Los datos se analizaron con el software Infinicyt™.

Anticuerpo	Fluorocromo	Población celular	Lote	Media IMF	% Diferencias IMF	SD	CV (%)	P-valor
CD45	Pacific Blue™	CD45+/SSC <sub>low</sub> linfocitos	1	30003.96	103.58	5774.05	19.24	0.000
			2	14738.40		5675.95	38.51	
CD138	OC515	Células plasmáticas	1	2167.55	17.74	1070.81	49.40	0.48
			2	2634.92		1915.43	72.69	
CD38	FITC	Células plasmáticas	1	11055.50	35.61	7788.51	70.45	0.003
			2	17170.06		12526.14	72.95	
CD56	PE	CD56+/CD3-/CD19- células NK	1	2976.37	38.33	843.49	28.34	0.06
			2	2151.67		935.88	43.50	
β2-microglobulina	PerCP-Cyanine5.5	β2micro+/CD45+/SSC <sub>low</sub> linfocitos	1	49974.06	43.34	13239.10	26.49	0.004
			2	34864.38		15176.42	43.53	
CD19	PE-Cyanine7	CD19+ células B	1	8696.96	9.33	2196.34	25.25	0.05
			2	7955.05		2260.07	28.41	
CyLambda	APC-C750	CD19+ células B	1	6576.02	60.95	1772.72	26.96	0.02
			2	16838.58		8697.44	51.65	
CyKappa	APC	CD19+ células B	1	16457.50	70.99	12105.17	73.55	0.007
			1	56728.96		40708.41	71.76	

## 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.
- Es recomendable seguir el procedimiento operativo de calibración definido por EuroFlow para ajustar las condiciones del citómetro. Encontrará una guía completa (Cytometer Setup SOP) en la página web [www.euroflow.org](http://www.euroflow.org), la cual incluye recomendaciones para establecer la configuración del citómetro, ajustar los parámetros FCS y SSC, ajustar los voltajes de los fotomultiplicadores, ajustar la compensación y supervisar el funcionamiento del citómetro a lo largo del tiempo.
- Para evaluar la unión inespecífica del reactivo puede prepararse un tubo de control isotópico.

- La fabricación de este producto sigue las normas de producción y los sistemas de calidad en conformidad con la norma ISO 13485:2012.









## **BIBLIOGRAFÍA**

- McKenna RW, Kyle RA, Kuehi WM, Grogan TM, Harris NL, Coupland RW. Plasma cell neoplasms. 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, pp 200-213.
- Kyle RA, Rajkumar SV. Epidemiology of the plasma-cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20:637-664.
- van Dongen JJ, Lhermitte 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, Vidriales 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.
- Paiva B, Vidriales MB, Pérez JJ, Lopez-Berges MC, Garcia-Sanz R, Ocio EM et al. The clinical utility and prognostic value of multiparameter flow cytometry immunophenotyping in light-chain amyloidosis. *Blood* 2011; 117:3613-3616.
- 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 ed; approved guideline (2001). Villanova PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document M29-A2.
- Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdickova L, Brooimans RA, Bumbea H et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93: 431–438.

## **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.