

**Universidad
Norbert Wiener**

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Académico Profesional de Tecnología Médica

Tesis

Evaluación del desempeño de lisantes para el estudio de
inmunofenotipo por citometría de flujo de espectro completo en sangre
periférica en un laboratorio privado, Lima -2023

**para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en
Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica**

Presentado por:

AUTOR: Huamanyalli Villar, Elizabeth


CODIGO ORCID: 0009-0007-4259-0458

ASESOR: Mg. Champa Guevara, Cesar Alfonso

CODIGO ORCID: 0000-0002-9331-8397

Lima - Perú

2023

 Universidad Norbert Wiener	DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA Y DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN		
	CÓDIGO: UPNW-GRA-FOR-033	VERSIÓN: 01 REVISIÓN: 01	FECHA: 08/11/2022

Yo, Elizabeth Huamanyalli Villar egresado de la Facultad de Ciencia de Salud y Escuela Académica Profesional de Tecnología Médica en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica / Escuela de Posgrado de la Universidad privada Norbert Wiener declaro que el trabajo académico “Evaluación del desempeño de lisantes para el estudio de inmunofenotipo por Citometría de Flujo de Espectro completo en sangre periférica en un Laboratorio Privado, Lima-2023” Asesorado por el docente: Mg. César Alfonso Champa Guevara DNI: 09850357 ORCID: 0000-0002-9331-8397 tiene un índice de similitud de (8) (ocho) % con código: 14912: 280778639 verificable en el reporte de originalidad del software Turnitin.

Así mismo:

1. Se ha mencionado todas las fuentes utilizadas, identificando correctamente las citas textuales o paráfrasis provenientes de otras fuentes.
2. No he utilizado ninguna otra fuente distinta de aquella señalada en el trabajo.
3. Se autoriza que el trabajo puede ser revisado en búsqueda de plagios.
4. El porcentaje señalado es el mismo que arrojó al momento de indexar, grabar o hacer el depósito en el turnitin de la universidad y,
5. Asumimos la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión en la información aportada, por lo cual nos sometemos a lo dispuesto en las normas del reglamento vigente de la universidad.



.....
 Firma de autor
 Nombres y apellidos del Egresado
 DNI: 46793790



.....
 Firma
 MG. Champa Guevara César Alfonso
 DNI: 09850357

Lima, 17 de octubre de 2023

Tesis

Evaluación del desempeño de lisantes para el estudio de inmunofenotipo por Citometría de Flujo de espectro completo en sangre periférica en un laboratorio privado, Lima -2023.

Línea de investigación

Control de calidad

Asesor (a)

Mg. Champa Guevara, Cesar Alfonso

CODIGO ORCID: 0000-0002-9331-8397

DEDICATORIA

Quiero dedicar este presente trabajo, en primer lugar, a Dios por permitirme a culminar mis estudios, por darme salud y fortaleza para seguir luchando por mis metas y sueños. A mi abuela Justina Ruíz que está en el cielo, por ser mi guía y mi ángel que me cuida.

A mis padres Pedro y Candelaria por ser padres extraordinarios, por enseñar ser una hija con valores, a pesar de las dificultades me educaron y no me dejaron rendirme.

A mis hermanos, tíos y primos. En especial a mi tía Martina y mi hermana Nelly por motivarme a cumplir mis sueños, por estar a mi lado en las buenas y malas.

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser mi guía, fortaleza para superar cada batalla, obstáculo a lo largo de este proyecto de vida.

A mis asesores Lic. César Champa por su tiempo brindado y apoyo en el desarrollo de la tesis, a Lic. Julia Moya Narango por la paciencia, por compartir su conocimiento y su apoyo incondicional para culminar este trabajo.

Al Dr. Richard Dyer, Ing. Alberto Zafra y la Lic. Katya Pérez por brindarme su apoyo para llevar a cabo este presente estudio. A mis compañeros del trabajo y a mis amigas(os) por motivarme para perseguir mis sueños y seguir escalando hasta llegar muy alto.

A mis maestros por sus enseñanzas y sus consejos durante mi formación universitaria.

INDICE

INDICE DE TABLAS	6
INDICE DE GRÁFICOS	8
RESUMEN	8
Abstract	10
INTRODUCCIÓN	11
CAPITULO I: EL PROBLEMA	1
1.1 Planteamiento del problema.	1
1.2. Formulación del problema.	1
1.2.1. Problema general.	1
1.2.2. Problemas específicos.	1
1.1 Objetivos de la investigación.	1
1.3.1 Objetivo general.	1
1.3.2 Objetivos específicos.	2
3.6 Justificación de la investigación	2
1.4.1 Teórica	2
1.4.2 Metodológica	2
1.4.3 Práctica	3
1.5. Limitaciones de la investigación.	3
1.5.1 Temporal.	3
1.5.2 Espacial	3
1.5.3 Recursos.	3
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.	4
3.6 Antecedentes.	4
2.2. Bases teóricas.	7
2.3. Formulación de hipótesis.	12
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	13
3.1. Método de la investigación	13
3.2. Enfoque de la investigación.	13
3.3. Tipo de investigación	13
3.4. Diseño de la investigación.	13
3.5. Población, muestra y muestreo.	13
3.6 Variables y operacionalización	15
3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.	16
3.7.1. Técnica.	16
3.7.2. Descripción de instrumentos.	18
3.7.3. Validación	21
3.7. 4 confiabilidad.	21

3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos.....	21
3.9. Aspectos éticos.....	22
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	23
4.1 Resultados.....	23
4.1.1 Análisis descriptivo de los resultados.....	23
4.1 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	37
V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	40
1.1 CONCLUSIONES.....	40
1.1 RECOMENDACIONES.....	41
REFERENCIAS.....	42
ANEXOS.....	46

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Poblaciones de leucocitos utilizados para cálculo de índice de tinción.	20
Tabla 2: Perfil de inmunofenotipo para designación de poblaciones.	22
Tabla 3: Porcentaje de pérdida de leucocitos totales luego del tratamiento con cada lisante evaluado	23
Tabla 4: Stain Index (Cálculo de la resolución entre leucocitos y debris).....	24
Tabla 5: Comparación en pares para la separación entre el debris y los linfocitos.	24
Tabla 6: Promedios de porcentajes de poblaciones de leucocitos en sangre periférica con los tres lisantes evaluados.....	26
Tabla 7: Comparación en las frecuencias de poblaciones entre el lisante patrón (EI) con los evaluados (EE y RBL).....	26
Tabla 8: Comparación de promedios de CV y DS en la dispersión frontal de eventos en FSC por población.	28
Tabla 9: Comparación por pares (prueba de Bonferroni) de promedios de CV y DS entre el lisante patrón (EI) con los evaluados (EE y RBL), en la dispersión de eventos en FSC por población.	29
Tabla 10: Comparación de promedios de CV y DS en la dispersión lateral de eventos en SSC por población.....	30
Tabla 11: Comparación por pares (prueba de Bonferroni) de promedios de CV y DS entre el lisante patrón (EI) con los evaluados (EE y RBL), en la dispersión de eventos en SSC por población.	30
Tabla 12: Comparación de las resoluciones de los 8 fluorocromos con los diferentes lisantes evaluados.....	32
Tabla 13: Prueba de Bonferroni de resolución de fluorescencia.	32
Tabla 14: Coeficientes de variación de los fluorocromos.....	34
Tabla 15: Prueba de Bonferroni CV de los 8 fluorocromos.	34

INDICE DE GRÁFICOS

Figura 1: Fórmula de índice de tinción para evaluación de la resolución entre poblaciones....	19
Figura 2: Diferencia de resolución entre debris y linfocitos de los 3 lisantes evaluados.	24
Figura 3: Comparación de las dispersiones de leucocitos y debris.	25
Figura 4: Gráfica de las diferencias de los lisantes evaluados en neutrófilo, linfocito, monocitos, eosinófilos y basófilos.....	27
Figura 5: Comparación de la dispersión de eventos tratados con lisantes EE (naranja) y RLB (rojo) frente al patrón EI (líneas verdes 1DS y 2DS).	31
Figura 6: Comparación de promedios y desviación estándar de la resolución de FITC y PB. .	33
Figura 7. A: curvas de 1 y 2 DS y mediana de EI en verde, comparando el solapamiento con EE en naranja. B: curvas de 1 y 2 DS y mediana de EI en verde, comparando el solapamiento con RLB en rosado.....	36

RESUMEN

- **OBJETIVO:** Evaluar el desempeño de lisantes para el estudio de inmunofenotipo por Citometría Flujo de espectro completo en sangre periférica en un laboratorio privado, Lima-2023. **MATERIALES Y METODOS:** El presente es un estudio cuasiexperimental, descriptivo, prospectivo, de enfoque cuantitativo y de tipo aplicada, donde se evaluó el desempeño de 3 soluciones de lisis de hematíes: Excellyse I (Exbio, Praga, República Checa), Excellyse Easy (Exbio, Praga, República Checa) y RBC Lysis (Tonbo Biosciences, San Diego, EE. UU.) en 21 muestras de sangre periférica marcadas con anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos, en un panel de 8 colores y adquiridas en el citómetro de flujo de espectro completo Northern Lights- NL3000-CLC (Cytek Biosciences, CA, USA). **RESULTADOS:** Los lisantes evaluados no mostraron pérdida significativa de las poblaciones celulares (<0.05), el Excellyse I mostró mayor separación entre linfocitos y debris con un promedio de 3.8; en las frecuencias de las poblaciones, el Excellyse Easy (EE) y Excellyse I mostraron diferencia estadísticamente significativa en las poblaciones minoritarias (Basófilos, Eosinófilos y monocitos), mientras con RBC Lysis (RBCL) frente al Excellyse I (EI) mostraron diferencia significativa ($p<0.05$) en todas las poblaciones. En cuanto a las intensidades de fluorescencias, se observó diferencia significativa en FITC (Isiotiocianato de fluoresceína) y Pacific Blue (PB) de muestras marcadas con los lisantes probados. El excellyse I mostró coeficiente de variación bajo y la distribución de las poblaciones celulares adecuadas. **CONCLUSION:** Según los resultados obtenidos se eligió al lisante Excellyse I, porque permite mejor separación entre los linfocitos y debris, conserva las intensidades de fluorescencia media y mejor resolución de los fluorocromos y demostró una dispersión adecuada en dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) para la separación de leucocitos. Por lo tanto, Excellyse I mostró un buen desempeño en protocolos de marcaje de antígenos de superficie (incluye lisis de hematíes y lavados por centrifugación) para el citómetro de flujo de espectro completo Northern Lights 3000-CLC.

PALABRAS CLAVE: Lisantes, Inmunofenotipo, Evaluación, Citometría de Flujo.

Abstract

OBJECTIVE: To evaluate the performance of lysants for the study of immunophenotype by full spectrum flow cytometry in a private laboratory in Lima. **MATERIALS AND METHODS:** This is a quasi-experimental, descriptive, prospective, quantitative and applied study, where the performance of 3 red blood cell lysis solutions was evaluated: Excellyse I (Exbio, Prague, Czech Republic), Excellyse Easy (Exbio, Prague, Czech Republic) and RBC Lysis (Tonbo Biosciences, San Diego, USA) in 21 peripheral blood samples labeled with monoclonal antibodies linked to fluorochromes, in an 8-color panel and acquired in the cytometer of full spectrum flow Northern Lights- NL3000-CLC (Cytek Biosciences, CA, USA). **RESULTS:** The evaluated lysants did not show significant loss of cell populations (<0.05), Excellyse I showed better separation between lymphocytes and debris with an average of 3.8, in the population frequencies differences were observed between Excellyse Easy (EE) and Excellyse I showed a statistically significant difference in the minority populations (Basophils, Eosinophils and Monocytes), while with RBC Lysis (RBCL) versus Excellyse I (EI) they showed a significant difference ($p<0.05$) in all populations. Regarding fluorescence intensities, a difference was observed in FITC (Fluorescein Isothiocyanate) and Pacific Blue (PB). Excellyse I showed a low coefficient of variation and the distribution of adequate cell populations. **CONCLUSION:** According to the results obtained, Excellyse I lysante was chosen, because it allows a better separation between lymphocytes and debris, preserves the average fluorescence intensities and better resolution of the fluorochromes and demonstrated adequate dispersion in forward scatter (FSC) and side scatter (SSC). for the separation of leukocytes. Therefore, Excellyse showed good performance in surface antigen labeling protocols (includes red blood cell lysis and centrifugation washes) for the Northern Lights 3000-CLC full-spectrum flow cytometer.

KEYWORDS: Lysants, Immunophenotype, Evaluation, flow cytometry.

INTRODUCCIÓN

El estudio de inmunofenotipo por Citometría de Flujo brinda información relevante para el diagnóstico y seguimiento de las neoplasias hematológicas. Por lo tanto, los protocolos para inmunofenotipificación se basan en uso de soluciones lisantes para la eliminación de los hematíes, con el fin de reducir los efectos de interferencias en la adquisición e interpretación de datos durante el análisis posterior. Para ello, es importante la selección de una solución de lisis adecuado basados en los criterios de la estandarización de Euroflow™.

La incorporación de nuevas tecnologías al laboratorio, como la citometría de espectro completo, implica evaluar las condiciones para verificar un buen desempeño de la plataforma de trabajo (que incluya el método, protocolo y reactivos). El uso adecuado del lisante disminuye la variabilidad en la dispersión de los eventos, que ocurre por las diferencias en las configuraciones de los instrumentos y de esta manera se obtienen resultados comparables. Asimismo, se considera como una buena práctica el desarrollo e implementación de protocolos estandarizados que permitan a los laboratorios brindar resultados reproducibles y fiables. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el desempeño de los lisantes para estudio de inmunofenotipo por Citometría de Flujo de espectro completo con la finalidad de seleccionar una solución de lisis con menor pérdida celular, que no altere las frecuencias y distribuciones celulares (FSC/SSC) ni las intensidades de fluorescencias.

La presente investigación consta de cinco capítulos, en el capítulo I donde se realiza el análisis problemático y se hace planteamiento del problema general, ¿Cuál será el lisante con mejor desempeño para el estudio de inmunofenotipo por Citometría de Flujo de espectro completo en sangre periférica en un laboratorio privado, Lima-2023?, de igual manera se formula el objetivo general y específicos, se delimita y se justifica el trabajo. En el capítulo II, se recopila los antecedentes, bases teóricas y se finaliza con el planteamiento de la hipótesis. En el capítulo III, se describe la metodología y el diseño de investigación. Y, además, se describe las poblaciones, las variables y operacionalización, técnicas e instrumentación de recolección de datos, procesamiento y análisis de datos, por último, los aspectos éticos fueron aprobados por el comité de ética de la universidad Norbert Wiener. En el capítulo IV consiste en la presentación y discusiones de los resultados obtenidos. Finalmente, el capítulo V presenta conclusiones y recomendaciones.

CAPITULO I: EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema.

La Citometría de Flujo de espectro completo es una nueva tecnología con más alternativas de emisión de las fluorescencias, por lo cual facilita paneles multicolores de mayor complejidad y el análisis simultáneo de una gran cantidad de parámetros celulares en un mismo experimento. A diferencia de la Citometría de Flujo convencional, que detecta una banda limitada del espectro de fluorescencia, la citometría de espectro completo mide la firma espectral emitida por cada uno de los fluorocromos. Esto permite un mapeo mucho más profundo de cada fluorocromo, la detección y discriminación simultánea de fluorocromos que antes no eran posibles. Además, en la Citometría de Flujo de espectro completo se realiza lo que se denomina deconvolución. Por lo cual, es una ventaja respecto a la compensación, ya que se elimina la subjetividad y la complejidad asociadas al enfoque de los citómetros convencionales.^{(1) (2)}

La mayor parte de protocolos están diseñados para el marcaje de leucocitos e incluye la lisis de hematíes o glóbulos rojos (elementos formes no nucleados) en uno o más pasos, sumados al lavado por centrifugación; ya que son interferentes en la interpretación de datos; sin embargo, está reportado en la literatura que, tras este proceso, puede resultar como efecto la reducción significativa de leucocitos, viéndose más afectadas las poblaciones minoritarias.⁽³⁾

La lisis de los eritrocitos tiene numerosas consecuencias en el inmunofenotipo, incluida la pérdida de células, diferencias en las dispersiones lateral (SSC) y frontal (FSC) y cambios en la tinción de anticuerpos para el análisis. Reconocer estas diferencias es importante para configurar e interpretar los ensayos basados en lisis con lavado. Es fundamental seleccionar un método y reactivo que sea mejor para el estudio de inmunofenotipo y validar el protocolo teniendo en cuenta los objetivos específicos del ensayo.^{(4) (5)}

El inmunofenotipo por Citometría de Flujo se ha convertido en una herramienta clave para el diagnóstico, la clasificación y el seguimiento de las neoplasias hematológicas. En 2012, el consorcio EuroflowTM desarrolló un enfoque completamente estandarizado para la inmunofenotipificación en neoplasias hematológicas que cubre todo el proceso de análisis de Citometría de Flujo, desde la configuración del instrumento a través de paneles de anticuerpos, reactivos y protocolos de preparación de muestras, hasta herramientas de software innovadoras y enfoques de análisis de datos.^{(6) (7)}

Es necesario la verificación del desempeño de las soluciones lisantes, basada en la evaluación de los trazados de dispersión (gráficas), buscando similitudes con los obtenidos en trabajos estandarizados referenciales, para los canales de fluorescencia y parámetros de dispersión de luz FSC y SSC, ya que un lisante adecuado puede disminuir la variabilidad en la dispersión de los eventos, que ocurre por las diferencias en las configuraciones de instrumentos y de esta manera obtener resultados estandarizados.⁽⁸⁾

Últimamente, se vienen haciendo esfuerzos importantes con el fin de mejorar la inmunofenotipificación por Citometría de Flujo, los debates centrales han incluido el trabajo de consenso y las directrices internacionales de un gran número de especialistas del área de Citometría de Flujo. Se han abordado consideraciones especiales para implementar paneles de inmunofenotipo para mejorar las prácticas de diagnóstico, así como buenas prácticas generales y clasificación de células en los campos de investigación y clínica. Sin embargo, pocos de ellos han abordado el impacto de las soluciones lisantes de hematíes en el inmunofenotipado celular.⁽³⁾
(9)

Por ser procesos estandarizados, se han incorporado ampliamente, en Latinoamérica y Perú, los protocolos EuroflowTM para el estudio de inmunofenotipo en la rutina de los laboratorios de Citometría de Flujo; sin embargo, su implementación está limitada a equipos e insumos de manera específica.⁽⁸⁾

En el laboratorio Cytometric Bioservices se plantea la implementación de estudios de neoplasias hematológicas por Citometría de Flujo de espectro completo, por lo tanto, se requiere de una adecuada selección de reactivos lisantes, en función a su sensibilidad y especificidad para la identificación y clasificación de linajes celulares que faciliten la caracterización de fenotipo normal y aberrante. De la misma manera, es importante que el laboratorio cuente con protocolos estandarizados que permitan obtener resultados reproducibles y fiables.⁽¹⁰⁾

1.2. Formulación del problema.

1.2.1. Problema general.

- ¿Cuál será el lisante con mejor desempeño para el estudio de inmunofenotipo por Citometría de Flujo de espectro completo en sangre periférica en un laboratorio privado, Lima - 2023?

1.2.2. Problemas específicos.

- a) ¿Cuál será la solución lisante que genere menor pérdida de la celularidad posterior a la lisis de la muestra marcada y lavada?
- b) ¿Cuál de los lisantes obtendrá mejor resolución entre los linfocitos y debris/ruido electrónico en la gráfica FSC/SSC, posterior a la lisis de muestra marcada y lavada?
- a) ¿Cuál de los lisantes obtendrá mejor resolución entre poblaciones y coeficiente de variación de las fluorescencias según sus intensidades de fluorescencia media (IFM)?
- b) ¿Cuál de las soluciones lisantes afecta en menor proporción las frecuencias de las poblaciones leucocitarias?
- c) ¿Cuál de las soluciones lisantes obtendrá una mejor distribución de las poblaciones celulares en FSC y SSC y menor alteración en los porcentajes de coeficiente variación entre lisante patrón y lisantes evaluados?

1.1 **Objetivos de la investigación.**

1.3.1 Objetivo general.

“Evaluar el desempeño de lisantes para el estudio de inmunofenotipo por Citometría de Flujo de espectro completo en sangre periférica en un laboratorio privado, Lima-2023”.

1.3.2 Objetivos específicos.

- a) Evaluar la pérdida de celularidad posterior a la lisis de la muestra marcada y lavada.
- b) Determinar la resolución entre los linfocitos y debris/ruido electrónico, en la gráfica FSC/SSC posterior al marcaje.
- c) Evaluar el efecto de los lisantes en la resolución entre poblaciones y coeficiente de variación de las fluorescencias según intensidades de fluorescencia mediana (IFM).
- d) Evaluar el efecto de los lisantes en las frecuencias de poblaciones leucocitarias entre los lisantes.
- e) Evaluar el efecto de los lisantes en la distribución leucocitarias en FSC y SSC y el porcentaje de coeficiente de variación entre lisante patrón y lisantes evaluados.

3.6 Justificación de la investigación

1.4.1 Teórica

El siguiente estudio de investigación proporciona información sobre el desempeño de lisantes para el estudio de inmunofenotipado por Citometría de Flujo de espectro completo, tecnología innovadora que representa un cambio tecnológico en las plataformas analíticas. Los objetivos están basados en llevar el conocimiento a la comunidad científica, estudiantil y al personal de salud, sobre la relevancia de realizar la evaluación de soluciones de lisis de glóbulos rojos y el uso adecuado de los mismos para el estudio de inmunofenotipificación de neoplasias oncohematológicas por Citometría de Flujo.

1.4.2 Metodológica

Debido a que existen protocolos estandarizados que publican recomendaciones para el uso de soluciones lisantes en el estudio de neoplasias hematológicas por citometría de flujo. Se justifica la comparación de un método nuevo con un método utilizado como patrón previamente estandarizado para hacer la elección del lisante que demuestre el mejor desempeño en la aplicación que se desea demostrar. Este método fue diseñado siguiendo recomendaciones de la guía H62 de Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).

1.4.3 Práctica

Este estudio de investigación pretende demostrar, cuál es la solución lisante de glóbulos rojos con mejor desempeño para los estudios de neoplasias hematológicas que presenten las siguientes características: mínima pérdida celular, preservación de antígenos celulares con la mejor recuperación de intensidad de brillo de los fluorocromos utilizados, la mejor resolución entre los leucocitos y el debris (desecho) y una mínima alteración en las distribuciones de las poblaciones en las muestras evaluadas, debido a que son criterios tomados en cuenta para la interpretación de datos de citometría. Es importante mencionar que los resultados obtenidos de este estudio van a contribuir en la decisión de seleccionar el lisante para el estudio de inmunofenotipo de neoplasias hematológicas por Citometría de Flujo de espectro completo. La estandarización de los protocolos de inmunofenotipo con el lisante adecuado, permitirá obtener resultados reproducibles y fiables y puede servir de guía para futuras estandarizaciones.

1.5. Limitaciones de la investigación.

1.5.1 Temporal.

El desarrollo de este estudio de investigación se llevó a cabo en el período de enero a agosto del año 2023

1.5.2 Espacial

El trabajo de investigación se realizó a cabo en un laboratorio privado, ubicado en Av. Del aire 1308 del distrito de San Luis, Lima-Perú.

1.5.3 Recursos

Se contó con el apoyo de laboratorio Cytometric Bioservices SAC para los insumos y reactivos requeridos en la investigación. En cuanto a recursos bibliográficos, se contó con bibliografías primarias, secundarias y artículos científicos.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.

3.6 Antecedentes.

1. Gonzales S. (2022) ⁽⁸⁾ el objetivo del estudio fue “Desarrollar la estandarización del citómetro Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos, utilizando la base de datos”, fue un estudio cuasiexperimental prospectivo de corte transversal de enfoque cuantitativo. En el cual, para la selección de lisante, utilizó 4 soluciones de lisis de eritrocitos (Optylise C, Facs Lysing, Excellyse I y Excellyse Easy) y 10 muestras de sangre total obtenidas en tubos con anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), para dicha evaluación tuvo en cuenta los siguientes criterios: menor pérdida de celularidad y alteración en la distribución de las poblaciones, adecuada separación de linfocitos y residuos celulares, mejor concordancia en los parámetros de dispersión FSC/SSC entre lisantes evaluados respecto al reactivo patrón, menor alteración de fluorescencia y el coeficiente de variación (CV). Obteniendo como resultado: El promedio de la pérdida celular fue 46.04%, el lisante que presentó una pérdida celular mayor fue Excellyse Easy, entre tanto las soluciones de lisis Optylise C, Facs Lysing mostraron menor pérdida y Excellyse I presentó un rendimiento medio. Aunque de las discrepancias, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) tras el análisis mediante la técnica ANOVA. En cuanto a la distribución de las poblaciones todo los lisantes mostraron valores similares, no se observó diferencias significativas en las poblaciones mayoritarias. No obstante, se encontraron diferencias en la población de basófilos ($p < 0,05$) entre el reactivo patrón, lisante Optylise C y Excellyse I. La mejor discriminación entre linfocitos y debris se logró con Optylise C y Excellyse I. Los lisantes con baja resolución fueron Facs Lysing y Excellyse easy. La solución de lisis con mejor superposición de eventos en los parámetros de dispersión de FSC/SSC comparados con los del lisante patrón fue excellyse I. Concluyó con que, el lisante de hematíes que brinda un rendimiento similar a la referencia corresponde a Excellyse I.⁽⁸⁾
2. Rico L, et. al., (2022) tuvieron como objetivo “Evaluar el impacto de las soluciones de lisis de eritrocitos en células dendríticas en comparación con la sangre completa sin lisar”. Para ello se evaluaron 3 soluciones de lisis de hematíes (Cylyse, Optylise, Pharma lyse) utilizando 20 muestras de sangre periférica. En los resultados observó que las soluciones lisantes pueden causar una reducción significativa de leucocitos, especialmente en las células dendríticas y basófilos que justamente corresponden a poblaciones minoritarias. Concluye, con que las

células dendríticas tienen mayor afectación seguidas a las poblaciones de basófilos, probablemente debido a la forma estrellada de la primera; además, las soluciones lisantes pueden causar cambios como: pérdida de celularidad, alteraciones de inmunofenotipo y alteración en la dispersión de la luz (FSC/SSC).⁽³⁾

3. Plank, et. al., (2021) el objetivo del estudio fue “Ampliar las investigaciones de los efectos en subconjuntos de leucocitos utilizando reactivos de lisis que se utiliza con frecuencia en la actualidad y comparar la integridad de lisis de glóbulos rojos”. Se recolectó 52 muestras de sangre periférica en los tubos con anticoagulante EDTA y se procesó a las 4 horas post extracción utilizando 4 soluciones de lisis (Facs Lysis, Quicklysis, Cloruro de amonio (NH₄Cl) y Versalyse), aplicando como referencia al protocolo Lyse no wash (sin lavado). Obteniendo como resultado; El protocolo lisis no lavado fue un adecuado método de referencia. Sin embargo, produjo dificultad en la selección de las poblaciones de linfocitos y monocitos debido a una distribución más amplia de la dispersión de la luz. La mejor integridad de lisis con restos de eritrocitos por debajo de 10% se logró utilizando NH₄Cl y Versalyse. Se observó pérdida de 11% de monocitos con Quicklysis. Los recuentos de linfocitos fueron 19% más bajos con Facs lysing; con NH₄cl y Versalysis se observó recuentos similares al protocolo patrón. En conclusión, los lisantes evaluados conducen desviaciones en el conteo de subconjuntos de leucocitos y muestran variaciones en la eficiencia de la lisis de eritrocitos.⁽⁹⁾

4. Li X, et. al., (2018) la investigación tuvo como objetivo “comparar la efectividad de 4 reactivos de lisis de los glóbulos rojos para el estudio de perfil inmune en un modelo de animal (musaraña arborícola)”. Para el estudio se utilizó 4 soluciones lisantes de los glóbulos rojos (BD Pharmalyse, RBC Lysis/fixation buffer, solución formaldehído al 1,5% y agua destilada), se agregó 50ul de muestra y se realizó lisis de acuerdo con los protocolos recomendados por los fabricantes; los datos fueron analizados por Citometría de flujo en Software FLOWjo 10.0.7 (FSC/SSC). Obteniendo como resultado, que entre los 4 lisantes el Pharma Lyse y agua mostraron lisis efectiva de los glóbulos rojos. Sin embargo, con la mezcla de agua destilada con formaldehído se observó muerte celular en los mononucleares. En conclusión, ven que es necesario estandarizar una solución de lisante para las células de modelo animal que se ha acogido a estudiar debido a los estudios que quieren aplicar por su semejanza con las células humanas en algunos tipos de enfermedades dentro de ellas neoplasias hematológicas. Adicionalmente encontraron que utilizando mayor volumen de sangre total y aumento de tiempo de lisis se mejoró la viabilidad de las células mononucleares.⁽¹¹⁾

5. Pan Q, et. al., (2014) el objetivo fue investigar el efecto de la exposición a cuatro lisantes en el recuento de basófilos de sujetos sanos y pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) mediante Citometría de Flujo. El estudio se realizó en 30 muestras de sangre periférica, del cual correspondieron a 15 muestras de pacientes sanos y 15 muestras de pacientes con LES. Se evaluaron 4 soluciones de lisis; RBC Lysis Buffer, Facs Lysing, tampón de lisis ACK (cloruro de amonio y potasio) y agua destilada. Obteniendo como resultado: La solución Facs Lysing y RBC Lysis Buffer conservaron las propiedades de dispersión en SSC y FSC de los leucocitos, tuvieron similar resultado en cuanto al recuento de basófilos, mientras con agua y ACK fueron afectados las dispersiones de FSC y SSC especialmente en los granulocitos. El FACS mostró ligeramente inferior intensidad de fluorescencia de CD203c con respecto a los demás lisantes. En conclusión; se observó que los reactivos de lisis mayormente utilizados pueden influir en las propiedades de dispersión de luz de los leucocitos, la precisión de la cantidad de número absoluto; ya que se evidenció que la lisis de eritrocitos con agua destilada y ACK reduce el número absoluto de los basófilos, pero no tienen efecto sobre el estado de actividad de los basófilos. Por el contrario FACS Lysing, que contiene formaldehído, redujo ligeramente la expresión de CD203c, pero no tuvo efecto en el recuento de los basófilos.⁽¹²⁾
6. Kalina, et. al., (2012) el objetivo de la investigación fue “Innovar y estandarizar la inmunofenotipificación para diagnóstico y clasificación de neoplasias hematológicas”, se realizó el estudio en 30 muestras de sangre periférica de donantes sanos y se evaluaron 4 soluciones de lisis de los eritrocitos ; Cloruro de Amonio, solución FACS Lysing (BD, Becton Dickinson), Quicklysis (Cytognos SL) y Versalyse (Beckman Coulter) para determinar cuál era la solución de lisis que mejor cumplía los siguientes criterios: bajo Coeficiente de variación (CV) en FSC y SSC, diferencias en los valores medios de los canales para FSC y SSC entre las poblaciones principales de leucocitos, mínima pérdida de células, conservación de brillo de los fluorocromos, ausencia de impacto en la estabilidad de los fluorocromos en tándem, baja tinción de fondo, variación mínima entre laboratorios y rendimiento fácil y rápido y siguiendo 3 protocolos Marcar/ lisar,/lavar (MLL), Marcar/lisar/ lavar,/fijar (MLLF) y Marcar/lisar/ no lavar (MLNL). Obteniendo como resultados que la mejor discriminación que se obtuvo para las poblaciones mayoritarias de sangre periférica a FSC y SSC, se alcanzó con FACS Lysing y NH₄CL independientemente del protocolo de marcaje utilizado. El protocolo MLNL se asoció con CV más bajos para todas las poblaciones celulares con todas las soluciones de lisis y también evidenció menor pérdida celular, a excepción de FACS Lysing que mostró CVs más bajos con el protocolo de MLL. Además, el FACS Lysing dio lugar a valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) más altos. No hubo diferencias significativas en los valores de IFM ni en los solapamientos de las emisiones de fluorescencias en los canales secundarios entre las 4 soluciones de lisis. En conclusión, se

decidió utilizar para el protocolo tinción -lisado-lavado la solución FACS Lysing para todos los marcajes de la membrana de superficie celular ya que las mediciones se realizan poco tiempo y cumple con los criterios evaluados.⁽¹³⁾

7. Einwallner E, et. al;(2013) el objetivo fue investigar el efecto de cuatro protocolos de soluciones de lisis diferentes en la recuperación de blastos leucémicos mediante Citometría de Flujo. Se realizó el estudio en 32 muestras de pacientes con neoplasias hematológicas, los recuentos de glóbulos blancos se realizaron por el analizador hematológico, recuento de blastos se hizo por microscopía y por Citometría de Flujo. La lisis de los eritrocitos se realizó con FACS Lysing, PharmaLyse, Optilyse C e IoTest 3 y se adquirieron 20 000 eventos como mínimo CD45 positivos en el citómetro FACS Canto. Obteniendo como resultado que la prueba de FRIEDMAN mostró una diferencia significativa entre los métodos de lisis (< 0.001). El porcentaje de los blastos después del tratamiento con FACS Lysing fue significativamente menor que después de PharmalyseTM ($p < 0.0001$), Optilyse C ($P < 0.0001$), IOTest 3 ($P < 0.0001$). La diferencia entre PharmalyseTM y Optilyse C ($P = 0,93$), IoTest 3 y Pharmalyse ($P = 0.31$) e Iotest 3 y Optilyse ($P = 0,34$) no fue significativo. Luego de la corrección con Bonferroni las comparaciones con FACS lysing siguieron siendo significativos. En conclusión, resaltan la importancia de la armonización de los protocolos de lisis de los eritrocitos para la aplicación de Citometría de Flujo en neoplasias hematológicas.⁽¹⁴⁾

2.2. Bases teóricas

- **CITOMETRIA DE FLUJO.**

La Citometría de Flujo es una técnica avanzada, objetiva y altamente sensible que permite la medición de las características físicas y químicas de las células o partículas suspendidas en un líquido que produce una señal de forma individual al interferir con un haz de luz de laser y permite analizar a alta velocidad un gran número de células. Los componentes de un citómetro de flujo clínico consisten en el sistema fluidíco, la fuente de luz, sistema óptico, componentes electrónicos y el sistema informático.^{(15) (16)}

Es ampliamente utilizado para diagnóstico y seguimiento de las enfermedades como leucemias, linfomas, inmunodeficiencia primaria, Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) y monitoreo del estado hematológico de pacientes con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) entre otros.⁽¹⁷⁾

a) Citometría convencional

La Citometría convencional utiliza espejos y filtros para seleccionar un rango de longitud de onda específico para detectar la señal de fluorocromos en los tubos fotomultiplicadores (PMTs) y mide un ancho de banda limitado del espectro; por cual, tiene limitado con algunos fluorocromos dentro de un panel. Por ejemplo, FITC y Alexa Flour no pueden ir juntos porque tienen emisiones similares y será reconocidos por el mismo detector. ⁽¹⁸⁾

b) Citometría de espectro completo.

La Citometría de Flujo de espectro completo tiene componentes principales igual que del citómetro convencional, así mismo el flujo de trabajo, la preparación de las muestras, reactivos y controles es lo mismo. La diferencia es que el citómetro de espectro completo permite medir la emisión completa de los fluorocromos de forma única a través por todas las líneas de láser, utilizando mucho más detectores en comparación con un citómetro convencional. Esto produce huellas espectrales específicas que se utilizan para distinguir matemáticamente un fluorocromo incluso cuando sus emisiones máximas son muy similares de otro. Se adapta bien al desarrollo de paneles altamente multiparamétricos. El espectro de emisión de cada molécula de fluorescencia es capturado por un conjunto de detectores en un rango de longitud de onda definido. ^{(19) (20)}

- **Procesamiento de muestras para estudios de inmunofenotipo.**

Para obtener resultados confiables de inmunofenotipo de neoplasias hematológicas es importante la fase de procesamiento de las muestras, lo cual consta de un paso inicial marcaje de la muestra con anticuerpos monoclonales (AcMo), seguido eliminación de hematíes y fijación luego de uno o dos lavados. La lisis de hematíes se produce mediante lisis osmótica o hipotónica luego de reacción de antígeno y anticuerpo con la finalidad de eliminar los glóbulos rojos que no son de interés en el estudio. ⁽²¹⁾

También existe protocolo para detección de antígenos intracitoplasmáticos se emplean reactivos de fijación y permeabilización. Y protocolos sin lavado, este es usualmente utilizado para recuentos celulares tales como recuentos de subpoblaciones linfocitarias y células hematopoyéticas (CD34+).⁽²²⁾

Técnicas de marcaje y lisis de glóbulos rojos

En la actualidad existen múltiples protocolos y reactivos para la tinción de leucocitos. La mayoría de los protocolos incluyen un paso de tinción, uno o más pasos de lavado y un paso de lisado de eritrocitos.(23)

- A. **Marcaje de antígenos de superficie.** Consiste en teñir las proteínas presentes en las superficies de las células. Para ello, se realiza el siguiente proceso: se agrega los reactivos en diferentes fluorescencias, luego se añade la muestra y se incuba por 20 a 30 minutos a temperatura ambiente. Después de haber transcurrido el tiempo, se agrega la solución de lisis de los glóbulos rojos, se procede el lavado de la muestra, el cual se basa en agregar solución de lavado, centrifugar, aspirar el sobrenadante dejando el botón leucocitario. Se repite el proceso de lavado y por último se resuspende con PBS y se adquiere en el citómetro de flujo.
- B. **Marcaje de antígenos intracitoplasmáticos.** Consiste teñir las proteínas intracelulares, para lo cual, las células necesitan ser fijados y permeabilizados. El proceso se basa en agregar reactivos de superficie, añadir la muestra, incubar por 20 a 30 minutos a temperatura ambiente a oscuridad, agregar la solución fijador, incubar por 10 minutos, luego lavar la muestra (agregar solución de lavado, centrifugar y aspirar el sobrenadante). Añadir la solución permeabilizante, luego reactivos intracitoplasmáticos, incubar y lavar la muestra. Por último, resuspender con PBS y adquirir en el citómetro de flujo.

Cualquier protocolo de lisis para estudios por técnica de Citometría de Flujo debe alcanzar los objetivos de estudio, considerando el costo, tiempo de procesamiento y cumplir las siguientes características: Mantener una adecuada resolución entre poblaciones mayoritarias de la muestra de acuerdo a los parámetros de dispersión de luz, minimizar la pérdida celular, preservar al máximo la estabilidad de los epítomos antigénicos e intensidad de fluorescencias y mantener bajos niveles de autofluorescencia y debris.⁽¹⁶⁾

- **SOLUCIONES LISANTES:**

Son soluciones que están diseñadas para lisar los hematíes después de tinción de anticuerpos de leucocitos de sangre periférica humana y se pueden utilizar en los procedimientos lisis/lavado o

lisis/no lavado.(24) lisan en condiciones osmóticas o hipotónicas conservando los glóbulos blancos ya que son la población de interés para estudios por Citometría de Flujo. En el mercado existen una serie de reactivos para la lisis de los eritrocitos disponibles comercialmente, que funcionan a través de diferentes mecanismos y muestran una eficacia diversa de la lisis de glóbulos rojos.(25)

La lisis de los eritrocitos es parte del procedimiento de muestras para estudios de inmunofenotipo por Citometría de Flujo con el fin aislar a los glóbulos blancos para su evaluación. Por lo que, la gran cantidad de los eritrocitos contaminantes pueden dificultar en reconocimiento de subpoblaciones de leucocitos, por lo que es importante que la interferencia del evitar la presencia de eritrocitos en la muestra.^{(4) (21)}

a) Componentes.

Las soluciones de lisis de eritrocitos para estudios de inmunofenotipificación por Citometría están conformados a base de cloruro de amonio o dietilenglicol con o sin soluciones fijadoras derivadas de formaldehído o metanol, con base agua desionizada.⁽¹²⁾

Las soluciones de lisis se pueden utilizar de las siguientes maneras.

- **LISIS CON LAVADO.** El proceso lisis con lavado se basa en marcar/lisar/lavar; quiere decir que se agrega anticuerpos monoclonales o reactivos, se incuba de 20 a 30 minutos a temperatura ambiente a oscuridad, luego se añade la solución lisante y se deja incubar según las instrucciones del fabricante. Después se centrifuga a 540g por 5 minutos, se aspira el sobrenadante dejando el botón leucocitario y se procede el segundo lavado. Este protocolo se utiliza para inmunofenotipificación de neoplasias hematológicas.⁽²⁶⁾
- **LISIS SIN LAVADO.** El proceso lisis sin lavado consiste en agregar reactivos, incubar 20 a 30 minutos a temperatura ambiente a oscuridad, luego se agrega la solución lisante para eliminar los hematíes y se incuba, el tiempo va a depender de las recomendaciones del fabricante del lisante utilizado. Por último, se adquiere con el citómetro. Este protocolo se utiliza para recuentos de subpoblaciones linfocitarias y recuentos de células progenitoras ya sean de forma volumétrica o con perlas.⁽²⁶⁾
- **CONSENSO DE PROTOCOLOS DE INMUNOFENOTIPO PARA ESTUDIOS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

El inmunofenotipado por Citometría de Flujo se ha convertido en la técnica de elección, porque es una técnica que cumple con los requisitos de alta velocidad y amplia aplicabilidad en el diagnóstico, y seguimiento de la enfermedad, además tiene enfoque preciso en la población de células malignas utilizando anticuerpos unidos a la membrana e intracelulares.⁽²⁷⁾

Con el fin de alcanzar mayor reproducibilidad en los resultados hubo diferentes concesos en las últimas décadas.

El grupo EuroFlow™ tiene como objetivo principal el desarrollo y estandarización de pruebas de Citometría de Flujo que facilite el desarrollo de protocolos estandarizados y validados para el inmunofenotipo de leucemias y linfomas que incluyen: una selección optimizada de las combinaciones de fluorocromos más adecuadas para paneles de 8 colores, la definición de protocolos estándar para la calibración del citómetro de flujo, la compensación de fluorescencias y el procesamiento y marcaje de muestras biológicas para inmunofenotipo de neoplasias hematológicas; además, el desarrollo de nuevas estrategias de análisis de datos e interpretación de los resultados con el objetivo de disminuir la variabilidad referida y alcanzar altos niveles de reproducibilidad en los resultados. (27)

El grupo Franceflow fue creado 2010, conformado por 15 entidades clínicas, con el fin de educar a todos los centros que realizan inmunofenotipificación por citometría de flujo en Francia sobre el instrumento estandarizado y protocolo de configuración desarrollado por el consorcio Euroflow™, así como para organizar los controles de calidad y evaluar la viabilidad de su aplicación. Por lo cual, el grupo FranceFlow demuestra que tanto la distribución y la aplicabilidad de procedimientos operativos estándar (SOP) han tenido éxito. (10)

El consorcio europeo ERIC (consorcio de infraestructuras de investigación europeas) se fundó en el año 2001 con el objetivo de desarrollar paneles de anticuerpos para la detección de la enfermedad mínima residual en la Leucemia linfática crónica. En 2007 se trabajó con panel de 4 colores, en 2013 actualizó a 6 colores con el que mejoraron la sensibilidad.

Human immunology Project Consortium (HIPC), creado en el año 2010 por el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos, el objetivo fue desarrollar pruebas de inmunofenotipo en individuos sanos e identificar cambios inmunológicos que se presentan en las patologías. (28)

El grupo COG (El childrens Oncology Group) y los grupos europeos AIEOP (Associazione italiana Ematología Oncologia pediátrica) y BFM (Berlin Frankfurt-Münster), son organizaciones más grandes del mundo y están enfocados en la detección de enfermedad mínima residual (EMR) de Leucemia Linfoblástica Aguda de células B, la cual es más común en niños y adultos jóvenes. En 2016 desarrollaron guías para realizar el inmunofenotipo para Leucemia Linfoblástica Aguda Pediátrica. (29)

2.2.2 Definiciones de términos

Inmunofenotipo: es la composición de la célula en función de los tipos de antígenos presentes en ella, en relación con su línea de crecimiento y grado de desarrollo. ⁽³⁰⁾

Stain index: índice de tinción, es el cociente entre la intensidad media de fluorescencia de la población negativa y población positiva.

FSC: Dispersión frontal, proporciona el tamaño de las células o partículas.

SSC: Dispersión lateral, proporciona complejidad de las células o partículas.

IFM: Intensidad de fluorescencia media, es un promedio de la intensidad de fluorescencia.

Coefficiente de variación (CV): Es una medida estadística que nos proporciona información sobre la dispersión relativa de un conjunto de datos. ⁽³¹⁾

Formato FCS: Es un formato de archivo de datos estándar asociado a los datos de los experimentos de citometría de flujo. ⁽³²⁾

2.3. Formulación de hipótesis.

La evaluación del desempeño de las soluciones lisantes para el estudio de inmunofenotipo por Citometría de Flujo de espectro completo permitirá seleccionar un lisante que demuestre mejor desempeño en los criterios evaluados, para el uso en los protocolos de inmunofenotipado para estudios de neoplasias hematológicas.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Método de la investigación

El método de investigación es deductivo, lo cual consiste en extraer una conclusión con base en una premisa o a una serie de proposiciones que se asumen como verdaderas. (33)

3.2. Enfoque de la investigación.

El enfoque del estudio es cuantitativo ya que las variables fueron analizadas estadísticamente a través de los datos numéricos obtenidos de cada experimento.

3.3. Tipo de investigación

Investigación aplicada, porque está centrada en resolver problemas de manera práctica, en un contexto determinado, es decir busca ampliar conocimiento práctico y útil desde una o varias áreas para satisfacer las necesidades.⁽³⁴⁾

3.4. Diseño de la investigación.

Estudio cuasi-experimental prospectivo de corte transversal de nivel del alcance descriptivo.

- Cuasi-experimental: no hay manipulación de variables, no se realiza selección ni asignación aleatoria de la población; prospectivo de corte transversal porque se recolectaron los datos en un solo tiempo, es decir en un tiempo único.
- El nivel de alcance es descriptivo comparativo consiste en especificar las características, indagar la incidencia y los valores en que se manifiesta una o más variables. En cuanto a comparativo, su finalidad es conocer la asociación que exista entre dos o más conceptos.
(35)

3.5. Población, muestra y muestreo.

Población: Las muestras de sangre periférica obtenidas por venopunción anticoagulada con EDTA K3.

Muestra

Para realizar el proceso de lisis se utilizaron 21 muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA K3 de donantes sanos del laboratorio Cytometric Bioservices SAC y fueron procesadas dentro de las 12 horas siguientes a su extracción.

Muestreo: El muestreo es no probabilístico de tipo incidental, consiste en reclutar a los donantes voluntarios que quieran participar en el estudio hasta que se complete el número de sujetos necesario para completar el tamaño de muestra deseado y no pretende que sea estadísticamente representativo de la población.⁽³⁶⁾

Criterios de inclusión

- Las muestras de sangre total con EDTA de donantes voluntarios sanos sin antecedentes de enfermedades neoplásicas o inmunológicos.
- Las muestras de sangre periférica con EDTA procesadas y adquiridas dentro de 12 horas posteriores a la recolección.
- Las muestras adquiridas con ajustes con los valores de IFM para el canal de FSC y SSC para cada uno de los lisantes.
- Muestras procesadas con respectivas soluciones lisantes según las indicaciones del fabricante.

Criterios de exclusión

- Las muestras con menos de 50.000 eventos positivos para CD45 (población leucocitaria).
- Las muestras adquiridas con ajustes en el citómetro diferentes a lo establecido.
- Muestras con un tiempo mayor a 12 horas luego de su recolección.

3.6 Variables y operacionalización

VARIABLES	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Escala de medición	Instrumento
Desempeño de lisantes para estudio de inmunofenotipo	Son un conjunto de parámetros para determinar de manera objetiva y cuantitativa el desempeño de los lisantes para el estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo de espectro completo	Pérdida leucocitaria	% de pérdida de leucocitos	Cuantitativa - Continua	Ficha de recolección
		Resolución entre linfocitos y debris	Resolución (Stain index)		
		Efecto en los valores relativos de las poblaciones leucocitarias.	% de la pérdida de la población con respecto al lisante patrón		
		Efecto en la dispersión de poblaciones leucocitarias en FSC y SSC	CV de las poblaciones en FSC/SSC		
			media \pm 1DS		
			media \pm 2DS		
		Efecto en la resolución de la fluorescencia según IFM.	CV de las poblaciones en las fluorescencias utilizadas		
			media \pm 1DS		
			media \pm 2DS		
			Resolución (Stain index)		

Elaborado por: Elizabeth Huamanyalli Villar.

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.

3.7.1. Técnica.

Para recopilar datos, en el presente estudio de investigación se utilizó la técnica de observación mediante los protocolos experimentales para selección de soluciones de lisis de eritrocitos con mejor desempeño. Se procedió los siguientes procesos.

a) Preparación de la muestra y datos hematológicos.

Se recolectó muestras de sangre periférica en tubo de 3ml con anticoagulante EDTA de 21 voluntarios sanos (edades entre 8 a 59 años). Los voluntarios, o sus apoderados, firmaron un consentimiento informado, como aprobación de su participación en el estudio. Las muestras se procesaron dentro de 12 horas posterior a su recolección.

Para obtener datos de biometría hemática se procesó una alícuota de cada muestra en el analizador DH76 (Dymind Biotechnology, Shenzhen, China), para obtener los valores de recuento absoluto de leucocitos y 5 diferenciales de poblaciones leucocitarias.

b) Marcaje de muestras con anticuerpos.

Las muestras se procesaron durante 3 días con la técnica de marcaje/lisado/lavado. Se preparó un cóctel de anticuerpos de 8 colores, siguiendo las recomendaciones de fluorescencias del consorcio Euroflow™, para el marcaje de las muestras de cada día. Los volúmenes de anticuerpos utilizados en el panel siguieron las pautas de titulación de la estandarización interna del laboratorio.

Se marcó 200ul de muestra con una alícuota de 20ul del cóctel de anticuerpos (ver anexo 1), se incubaron durante 20min, a temperatura ambiente y oscuridad previo a la lisis de hematíes. Transcurrido el tiempo de incubación se repartió la muestra en 3 tubos rotulados con el código del caso y nombre de lisante, pipeteando 55ul de la mezcla en cada uno.

c) Proceso de lisis de hematíes

Este proceso se realizó con tres lisantes: Excellyse Easy (Exbio, Praga, República Checa), Excellyse I (Exbio, Praga, República Checa) y RBC Lysis Buffer (Tonbo Biosciences, San Diego, EEUU).

Los volúmenes y el procesamiento se ajustaron de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes (ver anexo 2,3,4). Luego de los lavados para retirar las soluciones lisantes, la muestra del tubo de Excellyse Easy y Excellyse I se resuspendió con PBS, mientras al de RBC Lysis (RBCL) se resuspendió con solución PBS + fijador en base de formaldehído en concentración de 0.1%, según los protocolos experimentales de fijación.⁽³⁷⁾

d) Adquisición de la muestra

La adquisición de las muestras se realizó en el Citómetro del Flujo de espectro completo NL3000 CLC. Previamente realizado el mantenimiento diario del citómetro, así como las verificaciones de estabilidad y seguimiento con perlas de control de calidad SpectroFlo® QC Beads (Cytex Biosciences, CA, USA). El mantenimiento diario del citómetro establecido con recomendaciones del fabricante comprende pasos de lavados con Contrad (es una solución a base de detergente), hipoclorito diluido (1 en 10 partes de agua desionizada) y agua desionizada.

La aceptación de uso del citómetro de flujo se dio en función a los reportes de la plataforma de calibración y seguimiento del instrumento con resultados satisfactorios.

Se adaptó tres planteados para la adquisición en el software SpectroFlo CLC.1.0 (Cytex Biosciences, CA, USA). Los parámetros de dispersión de luz quedaron definidos en referencia a los linfocitos, de una misma muestra de sangre periférica sin marcar, tratada en tres tubos con el lisante correspondiente, ajustando en todos los planteados con valores de IFM para el canal FSC de 880000 y para SSC 208000, mientras que el umbral de adquisición se fijó en 160000. Se habilitaron los 8 canales de fluorescencia y se programó para la adquisición en velocidad media, con límite de almacenamiento por archivo "fcs" de 100 000 eventos en la región de "leucocitos" establecida por una gráfica en el dispersograma de CD45-PO (Pacific Orange) versus SSC. Se habilitaron en el software una tabla estadística con el recuento absoluto (células/ul) de leucocitos en la región CD45+. Las muestras tratadas fueron adquiridas de manera inmediata en el Citómetro de Flujo.

3.7.2. Descripción de instrumentos.

El instrumento utilizado fue la ficha de recolección de datos elaboradas en Microsoft Excel 2016, lo cual cuenta con ítems de elaboración propia según los objetivos y matriz de operaciones de los variables con el fin de obtener datos requeridos y fueron revisados por 3 expertos, para el análisis estadístico de los datos se pasaron a programas MedcalC versión 20.027 y Analyse-it v5.80.2, se utilizaron las pruebas de Varianza (ANOVA) y Bonferroni.

Para el análisis de los datos de citometría, se utilizaron los softwares SpectroFlo (Cytex Biosciences, CA, USA) e Infinicyt (Cytognos, Salamanca, España).

Se evaluaron los siguientes criterios: pérdida de celularidad posterior a la lisis de la muestra marcada y lavada, resolución de los linfocitos respecto a los residuos (debris/ruido electrónico), efecto de los lisantes en la resolución de las poblaciones según las intensidades de fluorescencia mediana (IFMed) entre el lisante patrón y lisantes examinados y bajo CV de los fluorocromos, las frecuencias de las poblaciones leucocitarias entre lisantes, posterior a la lisis de muestra marcada y lavada, dispersión de las poblaciones en FSC y SSC con cada lisante.

1. Pérdida de celularidad posterior a la lisis de la muestra marcada y lavada.

Los resultados de recuento de celularidad se obtuvieron a partir del análisis en batch del software SpectroFlo y se exportaron en formato csv, los datos fueron revisados en Excel 2016 y ordenados en tablas. Se utilizó el análisis de varianzas (ANOVA) para comparar los recuentos de leucocitos del hemograma automatizado frente al valor absoluto obtenido por método volumétrico (NL3000 - CLC), en células por microlitro (célula/ul), de las muestras procesadas con los 3 lisantes.

2. Resolución entre linfocitos y debris.

Según las recomendaciones de la guía para la validación de ensayos realizados por citometría de flujo del Instituto de Estándares Clínicos y de laboratorio (CLSI- guía H62), la separación entre linfocitos y debris se evaluó mediante el cálculo de índice de tinción como se indica en la figura 1. La fórmula aplicada consiste en la división entre la resta de Intensidades de Fluorescencia media (IFM) de linfocitos menos las del debris y como denominador la desviación estándar del debris.(38)

$$\frac{(IFM_{\text{Linfocitos}} - IFM_{\text{Debris}})}{2 (DS_{\text{Debris}})}$$

Figura 1: Fórmula de índice de tinción para evaluación de la resolución entre poblaciones.

Luego de análisis de las poblaciones, los datos de intensidad de fluorescencia media (IFM) y desviación estándar (DS) se obtuvo en las tablas estadísticas con Infinicyt™ 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España), el cálculo de las fórmulas se realizó en Microsoft Excel 2016 y se ingresaron los datos a la ficha de recolección para el análisis estadístico. Para la comparación entre lisantes se realizó la prueba estadística de ANOVA a partir de los promedios de las resoluciones halladas.

3. Efecto de los lisantes en las resoluciones de las poblaciones según las intensidades de fluorescencia mediana (IFMed).

Para evaluar el efecto de los lisantes en las Intensidades de Fluorescencia Mediana (IFM) se calculó el grado de separación entre poblaciones positivas y negativas en cada parámetro de fluorescencia (resolución). Para esto se utilizaron los archivos analizados, previamente descritos, en formato cyt para obtener las IFM. Se aplicó el cálculo del índice de tinción recomendado por la guía H62 para la validación de ensayos realizados por Citometría de Flujo del CLSI.

El coeficiente de variación para cada fluorescencia se obtuvo exportando la tabla estadística del software Infinicyt en formato csv, compatible con Excel 2016.

En la tabla 3 se muestran las poblaciones tomadas como referencia por su IFM para el cálculo de índice de tinción (resolución).

Tabla 1: Poblaciones de leucocitos utilizados para cálculo de índice de tinción.

Fluorocromo	Población Positiva	Población Negativa
FITC (Isotiocianato de fluoresceína)	Neutrófilos	Linfocitos T
PE (Ficoeritrina)	Basófilos	Linfocitos T
PerCPcy5.5 (Proteína peridina -clorofila)	Linfocitos T	Linfocitos NK
PE-Cy7 (Ficoeritrina cianina 7)	Linfocitos B	Linfocitos NK
APC (Aloficocianina)	Monocitos	Linfocitos NK
APC- Cy7 (Aloficocianina cianina 7)	Linfocitos T CD8	Linfocitos T CD4
PB (Pacific Blue)	Linfocitos T CD4	Linfocitos T CD8
PO (Pacific Orange)	Linfocitos totales	Basófilos

*Fuente: Elaboración propia.

Además, se compararon la superposición de fluorescencia en gráficas de dos parámetros (PB/APCcy7, PercPCP/PEcy7; FITC/APC; PE/PO) de las poblaciones lisadas con el patrón y los evaluados, empleando la herramienta de visualización de datos con curvas de DS del Software en 1DS y 2DS. El criterio de aceptación en las gráficas correspondió a las coincidencias del IFM del lisante evaluado dentro de 1DS del patrón por cada población, el valor más alto de resolución y el menor valor de coeficiente de variación. Todos los datos obtenidos fueron ingresados en la ficha de recolección de datos elaborados en Microsoft Excel 2016, para su posterior análisis estadístico.

4. Evaluar el efecto de los lisantes en las frecuencias de poblaciones leucocitarias.

Para evaluar el efecto de los lisantes con respecto a la frecuencia de las poblaciones de leucocitos, se compararon los promedios de los porcentajes en cada una de las 5 poblaciones (Neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos), que se hallan en los archivos previamente fusionados por cada lisante en el programa de análisis Infinicyt 2.0. Los datos se obtuvieron utilizando las herramientas estadísticas de este y se exportaron en un formato csv. En la comparación de promedios se aplicó la prueba de ANOVA y, ante diferencias significativas, la corrección de Bonferroni.

5. Dispersión de las poblaciones en FSC y SSC en cada lisante.

La información recolectada fue analizada estadística y gráficamente, para ello, se analizaron los archivos de citometría en el programa infinicyt 2.0, obteniéndose las distribuciones de las 5 poblaciones leucocitarias (linfocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos) por cada lisante evaluado. Al finalizar se fusionaron los archivos de las 21 muestras analizadas en formato “cyt por cada lisante, resultando 3 archivos, de los que se tomaron los promedios de coeficiente de variación (CV) por población y además se obtuvieron los trazados que permitieron la comparación de las poblaciones lisadas, por superposición con el patrón y los evaluados, empleando la herramienta de visualización de datos con curvas de DS del software en 1DS y 2DS. Se compararon los valores de CV para identificar diferencias significativas.

3.7.3. Validación

Los instrumentos de recopilación de datos fueron validados por los 3 juicios de expertos de la Universidad Norbert Wiener.

3.7. 4 confiabilidad.

Todos los datos procesados se ingresaron en fichas de recolección de datos creadas en Excel 2016 y evaluadas por tres expertos de la Universidad Norbert Wiener. Luego fueron trasladado a una base del programa estadístico.

3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos.

Para el análisis de datos de citometría, se utilizaron los softwares SpectroFlo (Cytex Biosciences, CA, USA) e Infinicyt (Cytognos, Salamanca, España).

Para el análisis estadístico se emplearon los programas MedcalC versión 20.027 y Analyse-it v5.80.2, los datos obtenidos fueron ingresados a la ficha de recolección elaboradas en Microsoft Excel 2016; lo cual, fueron revisados por 3 juicios expertos de la universidad Norbert Wiener.

Para evaluar la comparación entre los lisantes se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) para muestras repetidas, tomando como significancia estadística al 95% (<0.05) y para comparaciones en pares se utilizó test de Bonferroni.

En el análisis de datos con el software de Citometría de Flujo se designaron a las poblaciones según los criterios de perfil de inmunofenotipo como se describe en la tabla 2.

Tabla 2: Perfil de inmunofenotipo para designación de poblaciones.

Población	Perfil Inmunofenotípico
Neutrófilos	CD16++/CD45+d/SSC alto
Basófilos	CD123 +++/CD45+d/SSC bajo
Linfocitos T	CD3+++/ CD45+++/ CD19-/CD16-
Monocitos	CD64++/CD4+d/CD16-/CD45++/SSC medio
LinfocitosT CD4	CD3 +++/ CD4 ++, CD45 +++/SSC bajo
Linfocitos totales	CD45 +++/SSC bajo/FSC pequeño
Linfocitos B	CD19 ++/CD3-/CD16-/ CD45+++/SSC bajo
Linfocitos T CD8	CD8 +++/CD3 +++/CD45 +++/SSC bajo
Linfocitos NK	CD16+/ CD3-/ CD19-/CD45+++/SSC bajo y FSC pequeño

Fuente: Elaboración propia

3.9. Aspectos éticos

El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Privada Norbert Wiener (ver anexo n°9).

Para la investigación se requirió 21 donantes voluntarios sanos que autorizaron su participación mediante un consentimiento informado. Se obtuvieron muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA, lo cual, fueron utilizados para prueba de lisantes. Se recolectó la información más relevante para el estudio y se asignó un código a cada paciente para mantener la confidencialidad.

El proyecto de investigación se contó con la autorización firmada por el director médico y Gerente general del establecimiento del laboratorio privado Cytometric Bioservices SAC para el uso de sus instalaciones, equipos, reactivos y materiales (ver anexo n°10)

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 Resultados.

4.1.1 Análisis descriptivo de los resultados.

1. Evaluación de la pérdida de celularidad posterior al procedimiento de marcaje.

Este parámetro fue evaluado mediante la comparación de los valores de leucocitos totales del analizador hematológico con los obtenidos por citometría de flujo por método volumétrico, posterior a la técnica de marcaje/ lisado/ lavado de 21 muestras con los 3 lisantes evaluados.

Tabla 3. *Porcentaje de pérdida de leucocitos totales luego del tratamiento con cada lisante evaluado*

Parámetros	Excelllyse Easy	Excelllyse I	RBCL	P valor*
Porcentaje de pérdida de leucocitos totales.	30.13 ± 11.41	32.41 ± 16.96	31.58 ± 12.05	0.867

. *Prueba de ANOVA. (Fuente: Propia).

La tabla 3 describe los promedios por cada lisante, con sus respectivas desviaciones estándar (DS). Se observó como resultado una pérdida de celularidad en promedio con los tres métodos de lisis de 31.37% después del método usado (marcado-lisado-lavado). El lisante Excelllyse Easy presentó promedio de pérdida celular de 30.13%, el lisante RBC Lysis el 31.58% y el Excelllyse I 32.41%. A pesar de las diferencias luego de aplicar la prueba de ANOVA para muestras repetidas no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en el nivel de pérdida de celularidad entre los tres lisantes, siendo el desempeño semejante.

2. Comparación de la resolución entre los eventos pequeños y de baja complejidad interna (área de linfocitos) respecto a debris/ ruido electrónico en la gráfica FSC/SSC posterior al marcaje.

Tabla 4. Stain Index (Cálculo de la resolución entre leucocitos y debris)

Lisantes	Excellyse I	Excellyse Easy	RBC Lysis Buffer	p
Resolución debris y leucocitos	3.8 ± 0.45	1.33 ± 0.27	2.57 ± 0.32	<0.001

* Prueba de ANOVA. (Fuente: Propia).

Tabla 5. Comparación en pares para la separación entre el debris y los linfocitos.

	Mean difference	Std. Error	P ^a	95% CI ^a
Excellyse_I - Excellyse_Easy	2.496	0.0849	<0.0001	2.274 to 2.717
- RBCL	1.251	0.112	<0.0001	0.959 to 1.544

*Prueba de Bonferroni (<0.05)- Fuente propia.

Figura 2: Diferencia de resolución entre debris y linfocitos de los 3 lisantes evaluados.

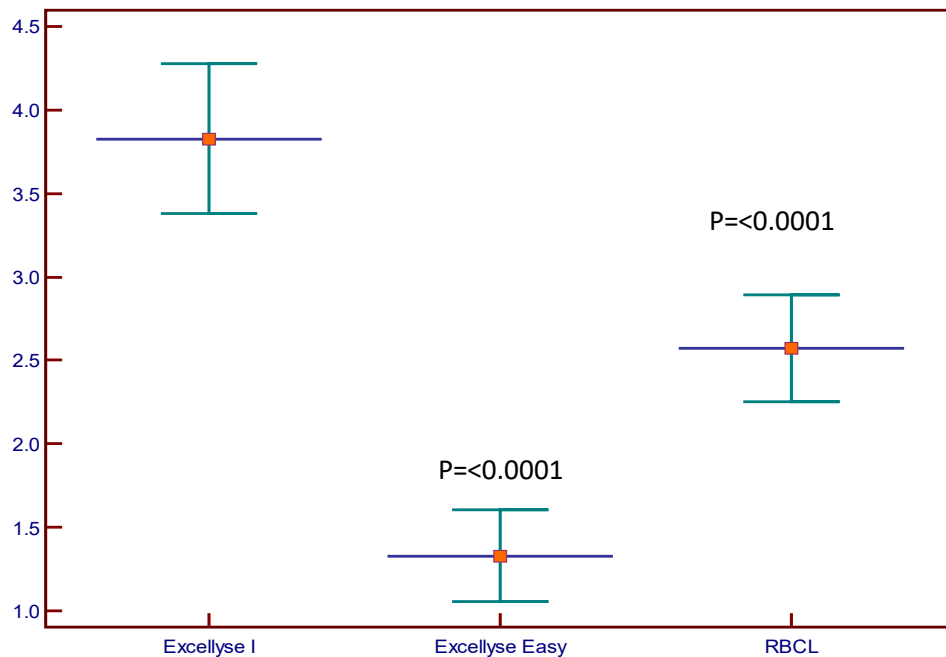
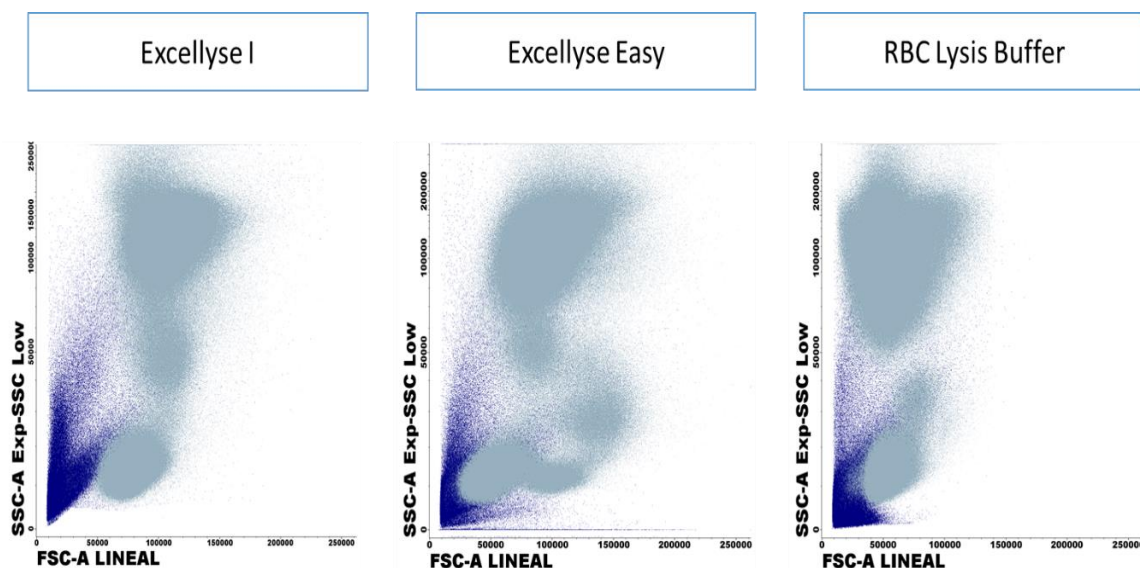


Figura 3: Comparación de las dispersiones de leucocitos y debris.



La figura 3 representa los 21 casos por cada lisante, fusionados por el software de análisis (Infinicyt) donde el debris se indica en color azul y a las dispersiones de los leucocitos en gris.

Los cálculos de resolución entre los linfocitos y los eventos considerados como debris fueron promediados y luego de aplicar test de Anova (tabla 4) mostró diferencia estadísticamente significativa entre los tres lisantes $p: <0.05$. Por lo tanto, se aplicó la comparación en pares mediante la prueba de Bonferroni (tabla 5) y se evidenció diferencia estadísticamente significativa entre lisante Excellyse I, Excellyse Easy y RBCL.

Por lo tanto, la mejor resolución en la separación de linfocitos y el debris luego de la evaluación de las 21 muestras, se logró con el Excellyse I (EI) con un promedio de 3.8 ± 0.45 . Los lisantes con menor resolución para discriminar entre linfocitos y el debris fueron RBC Lysis (RBCL) y Excellyse Easy (EE) con promedio de 2.57 ± 0.32 y 1.33 ± 0.27 respectivamente.

Al analizar los resultados de la tabla 4 y 5 junto a la gráfica 2 y 3 se observa que el uso de Excellyse I representa una ventaja al reducir las interferencias causadas por el debris y el solapamiento de éste con los leucocitos totales. Por ello, permitirá una adecuada discriminación entre el debris frente y las poblaciones leucocitarias, ya que son de importancia para estudios de inmunofenotipo por citometría de flujo.

3. Evaluación del efecto de los lisantes en las frecuencias de poblaciones de leucocitos.

Tabla 6. Promedios de porcentajes de poblaciones de leucocitos en sangre periférica con los tres lisantes evaluados.

Poblaciones Leucocitarias	Excellyse I (Referencia)	Excellyse Easy	RBC Lysis Buffer	p valor*
Neutrófilo	64.84 ± 8.03	63.11 ± 8.90	48.28 ± 13.95	<0.001
Linfocito	25.99 ± 5.54	24.54 ± 5.26	39.29 ± 11.28	<0.001
Monocito	4.6 ± 1.42	7.04 ± 2.16	6.90 ± 2.44	<0.001
Eosinófilo	4.05 ± 5.80	4.72 ± 6.48	4.63 ± 6.35	<0.001
Basófilo	0.52 ± 0.26	0.59 ± 0.28	0.90 ± 0.50	<0.001

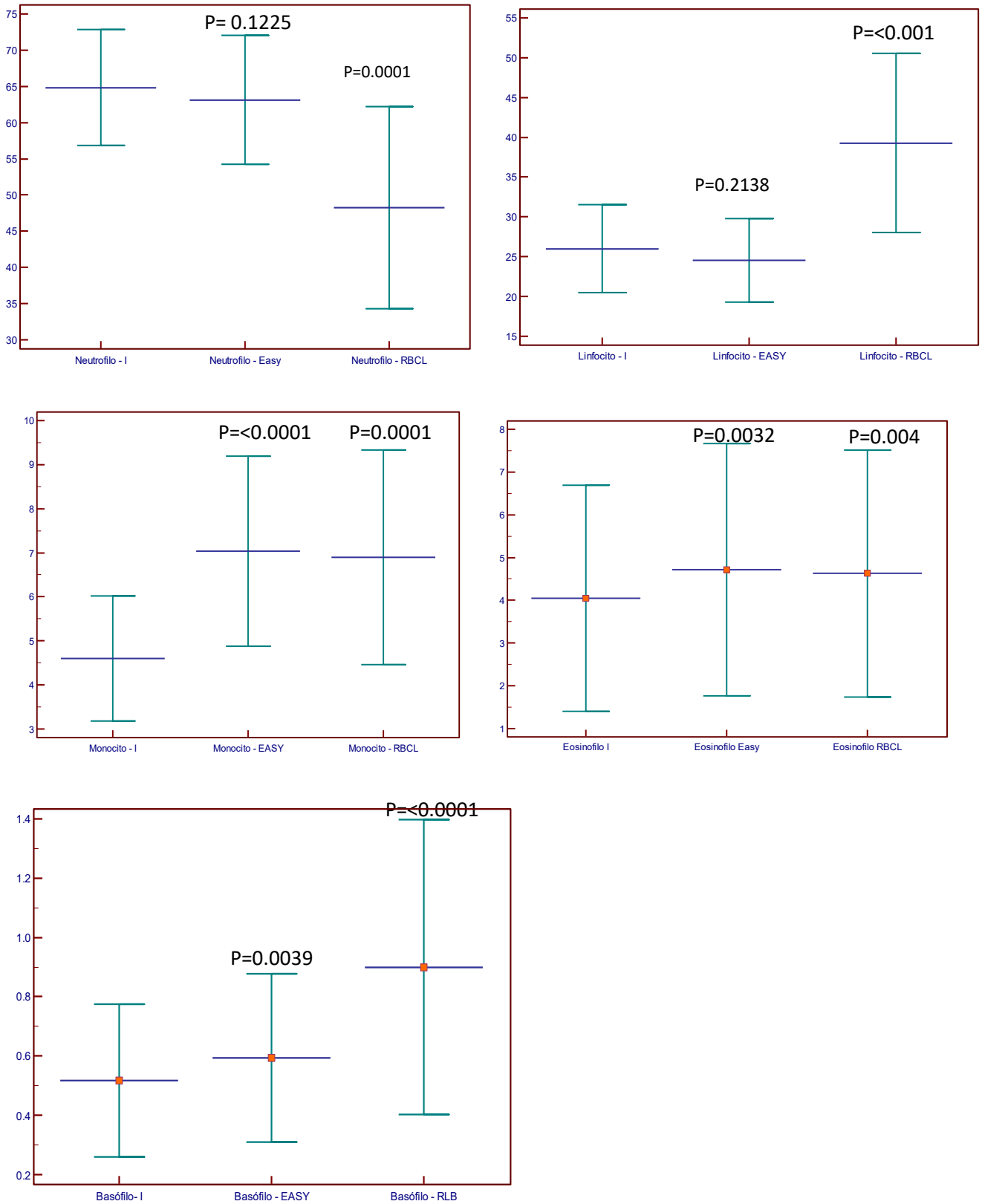
*Prueba de ANOVA. (Fuente propia).

Tabla 7: Comparación en las frecuencias de poblaciones entre el lisante patrón (EI) con los evaluados (EE y RBL)

Factors		Mean difference	Std. Error	P ^a	95% CI ^a
Linfocito_I	Linfocito_EASY	1.45	0.761	0.2138	-0.539 to 3.440
	Linfocito_RBCL	-13.303	1.8	<0.0001	-18.006 to -8.600
Monocito_I	Monocito_EASY	-2.435	0.279	<0.0001	-3.165 to -1.706
	Monocito_RBCL	-2.296	0.423	0.0001	-3.402 to -1.191
Neutrofilo_I	Neutrofilo_Easy	1.733	0.793	0.1225	-0.338 to 3.803
	Neutrofilo_RBCL	16.562	2.112	<0.0001	11.046 to 22.079
Eosinófilo_I	Eosinófilo_Easy	-0.672	0.176	0.0032	-1.132 to -0.213
	Eosinófilo_RBCL	-0.58	0.16	0.0049	-0.998 to -0.163
Basofilo_I	Basofilo_Easy	-3.88	0.337	<0.0001	-4.760 to -3.001
	basofilo_RBCL	-2.668	0.454	<0.0001	-3.855 to -1.480

*Prueba de Bonferroni.

Figura 4: Gráfica de las diferencias de los lisantes evaluados en neutrófilo, linfocito, monocitos, eosinófilos y basófilos.



En la tabla 6 podemos observar los promedios de los porcentajes de las frecuencias de las poblaciones celulares obtenidas posterior a procesamiento con los 3 lisantes evaluados en 21 muestras, los porcentajes encontrados son similares entre EI y EE en todas las poblaciones mientras con EI y RBCL hay diferencia. Para determinar si la variación es significativa se aplicó la prueba ANOVA, tomando como referencia el Excellyse I, para evaluar si los lisantes afectan a las frecuencias de las poblaciones de leucocitos, se demostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en todos los grupos celulares.

Por lo cual, se aplicó test de Bonferroni (comparación por pares) siendo las poblaciones mayoritarias como neutrófilos y linfocitos las que no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre EI y EE, pero las poblaciones minoritarias (monocitos, eosinófilos y basófilos) si mostraron diferencias significativas. Mientras que todos los grupos de las poblaciones leucocitarias mostraron diferencias significativas entre EI y RBCL.

Los resultados sugieren que los monocitos, eosinófilos y basófilos evidencian diferencias significativas entre lisante patron (EI) y EE, no se observó diferencias en las poblaciones mayoritarias como neutrófilos, linfocitos y mientras con RBCL se observó diferencias significativas en todas las poblaciones evaluadas.

4. Evaluación del efecto de los lisantes en la dispersión de poblaciones leucocitarias, a partir de la gráfica FSC/SSC.

4.1. Comparación de promedios de coeficiente de variación (CV) en el parámetro de dispersión FSC.

Tabla 8. Comparación de promedios de CV y DS en la dispersión frontal de eventos en FSC por población.

CV - FSC	Excellyse I	Excellyse Easy	RBCL	P value
Linfocitos	13.33 ± 0.89	32.26 ± 3.18	13.21 ± 1.16	<0.001*
Monocitos	13.31 ± 1.13	23.42 ± 3.14	12.61 ± 1.58	<0.001*
Neutrófilos	13.56 ± 1.91	18.24 ± 1.88	27.96 ± 3.96	<0.001*
Eosinófilos	20.45 ± 1.49	22.54 ± 0.75	34.67 ± 2.77	<0.001*
Basófilos	12.74 ± 1.23	16.62 ± 1.68	15.41 ± 1.82	<0.001*

*Prueba de ANOVA (Fuente propia).

Luego del análisis para la asignación de poblaciones se obtuvieron los valores de CV y DS de cada población, según la dispersión de eventos en la gráfica que enfrenta FSC/SSC. En la tabla 8 se muestran los valores promedio de dispersión de eventos y sus respectivas desviaciones estándar. En la comparación por ANOVA se encontraron diferencias significativas en las dispersiones en FSC entre los 3 lisantes. En este parámetro se observaron valores de CV en promedio más bajos en las muestras tratadas con el lisante de referencia comparados con los de los lisantes evaluados

Tabla 9: Comparación por pares (prueba de Bonferroni) de promedios de CV y DS entre el lisante patrón (EI) con los evaluados (EE y RBL), en la dispersión de eventos en FSC por población.

Factores		Diferencia de Medias	Error Estd.	P ^a	95% CI ^a
Linfocito_I	Linfocito_Easy	-18.922	0.681	<0.0001	-20.702 to -17.143
	Linfocito_RBCL	0.128	0.224	1	-0.456 to 0.712
Monocito_I	Monocito_Easy	-10.104	0.721	<0.0001	-11.989 to -8.219
	Monocito_RBCL	0.701	0.427	0.3485	-0.414 to 1.816
Neutrofilo_I	Neutrofilo_Easy	-4.686	0.222	<0.0001	-5.267 to -4.105
	Neutrofilo_RBCL	-14.406	0.98	<0.0001	-16.966 to -11.846
Eosinófilo_I	Eosinófilo_Easy	-2.092	0.335	<0.0001	-2.967 to -1.217
	Eosinófilo_RBCL	-14.22	0.642	<0.0001	-15.897 to -12.543
Basofilo_I	Basofilo_Easy	-3.88	0.337	<0.0001	-4.760 to -3.001
	basofilo_RBCL	-2.668	0.454	<0.0001	-3.855 to -1.480

En la comparación por pares, como se muestra en la tabla 9, sólo las dispersiones de linfocitos y monocitos de RBCL fueron semejantes a las del lisante de referencia y las dispersiones de células con gránulos tuvieron diferencias significativas, con valores de CV mayores.

Con respecto a las dispersiones de eventos de las poblaciones en las muestras tratadas con Excellyse Easy mostraron mayores CV en todas las poblaciones, con respecto a Excellyse I.

Tabla 10: Comparación de promedios de CV y DS en la dispersión lateral de eventos en SSC por población.

CV - SSC	Excellyse I	Excellyse Easy	RBCL	P value
Linfocitos	26.71 ± 1.96	27.08 ± 1.98	24.58 ± 1.77	<0.001*
Monocitos	26.05 ± 1.65	32.49 ± 4.45	19.06 ± 1.15	<0.001*
Neutrófilos	22.47 ± 1.74	23.95 ± 1.17	32.78 ± 4.49	<0.001*
Eosinófilos	18.70 ± 3.35	22.30 ± 2.39	26.78 ± 2.25	<0.001*
Basófilos	21.58 ± 3.35	24.99 ± 4.61	20.65 ± 1.60	<0.001*

*Prueba de ANOVA (fuente propia).

Tabla 11: Comparación por pares (prueba de Bonferroni) de promedios de CV y DS entre el lisante patrón (EI) con los evaluados (EE y RBL), en la dispersión de eventos en SSC por población.

Factors		Mean difference	Std. Error	P ^a	95% CI ^a
Linfocito_I	Linfocito_Easy	-0.366	0.299	0.7055	-1.146 to 0.415
	Linfocito_RBCL	2.141	0.269	<0.0001	1.438 to 2.844
Monocito_I	Monocito_Easy	-6.446	0.948	<0.0001	-8.923 to -3.970
	Monocito_RBCL	6.993	0.295	<0.0001	6.222 to 7.764
Neutrofilo_I	Neutrófilo_Easy	-1.469	0.316	0.0005	-2.293 to -0.644
	Neutrófilo_RBCL	-10.299	1.089	<0.0001	-13.143 to -7.454
Eosinófilo_I	Eosinófilo_Easy	-3.6	0.328	<0.0001	-4.457 to -2.744
	Eosinófilo_RBCL	-8.081	0.621	<0.0001	-9.705 to -6.458
Basofilo_I	Basófilo_Easy	-3.409	0.693	0.0002	-5.219 to -1.598
	Basófilo_RBCL	0.933	0.587	0.3828	-0.601 to 2.467

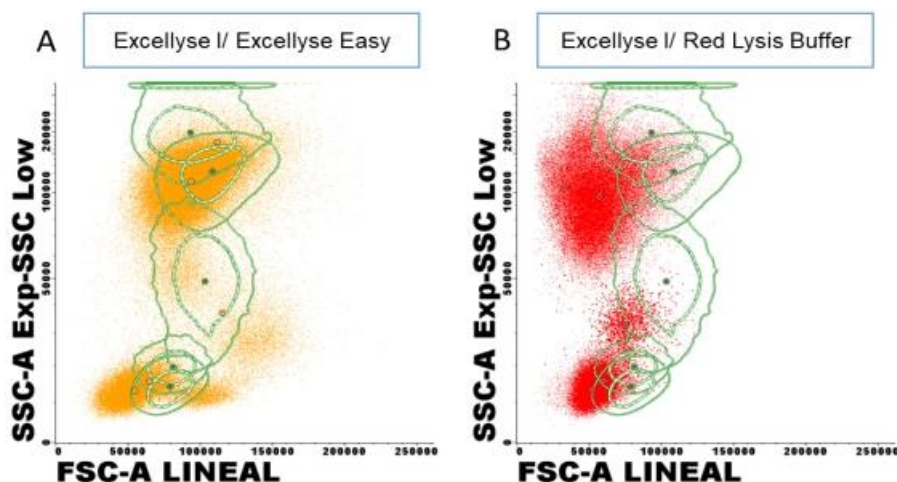
*Prueba de Bonferroni (fuente propia).

En la comparación por ANOVA (tabla 10) se encontraron diferencias significativas en las dispersiones en SSC entre los 3 lisantes en todas las poblaciones. Por lo tanto, se aplicó el estudio de Bonferroni para evidenciar la diferencia por pares, como se muestra en la tabla 11 y se observó que solo las poblaciones de linfocitos en las tratadas con Excellyse Easy no mostraron diferencias significativas con respecto al lisante de referencia y las tratadas con RBCL mostraron incluso, un menor CV en promedio. Con este último, la población de basófilos no mostró diferencias significativas con respecto a Excellyse I. En conclusión, las menores diferencias se evidenciaron con poblaciones de baja dispersión en complejidad interna.

Se observó menores valores de CV en promedio, en las muestras tratadas con lisante de referencia que en las tratadas con los lisantes evaluados.

4.2. Evaluación de la gráfica de dispersión FSC/SSC.

Figura 5: Comparación de la dispersión de eventos tratados con lisantes EE (naranja) y RLB (rojo) frente al patrón EI (líneas verdes 1DS y 2DS).



La gráfica 4A muestra las líneas de DS de EI (verde) con eventos y medianas de EE (naranja), los neutrófilos, eosinófilos y monocitos de EE coinciden con el patrón dentro de 1DS, en cambio los linfocitos y basófilos coincidieron dentro de 2DS.

En la gráfica 4B, las líneas de DS de EI (verde) con eventos y medianas de RBCL (rojo) muestran que los neutrófilos, eosinófilos y monocitos en RBL se disponen por fuera de 2DS con respecto al patrón, mientras que los linfocitos y basófilos se ubican cercanos al límite de 2DS.

La comparación del solapamiento de poblaciones de leucocitos se realizó utilizando la IFM (tanto de FSC como de SSC), como referencia y la coincidencia en la dispersión de los eventos de los lisantes evaluados entre 1DS y 2DS frente al lisante de referencia.

Los resultados mostraron que los lisantes evaluados producen cambios en las características físicas de las poblaciones de leucocitos, con respecto al patrón, los más evidentes con EE se identificaron solo en SSC, mientras que con RBCL fueron tanto en FSC como en SSC.

En la práctica, los resultados indican que el tratamiento con Excelllyse I facilita el análisis manual por el operador, debido a que los eventos de las muestras tratadas con este lisante se distribuyeron con menor dispersión alrededor del IFM tanto en FSC como en SSC, mostrando mayor delimitación entre los grupos de poblaciones.

5. **Evaluación del efecto de los lisantes en las Intensidades de Fluorescencia Mediana (IFM), según la resolución entre poblaciones y sus coeficientes de variación (CV).**

Tabla 12: Comparación de las resoluciones de los 8 fluorocromos con los diferentes lisantes evaluados.

Fluorocromos	EXCELLYSE I	EXCELLYSE EASY	RBCL	P value
FITC	418.67±143.13	395.18±160.65	322.24±134.13	<0.0025 *
PE	231.72 ± 95.95	215.26 ± 70.79	241.06±100.93	0.214
PERCPCY.5.5	55.53 ± 6.63	55.12 ± 7.87	53.47 ± 6.62	0.095
APC	29.91± 14.40	31.18 ± 13.58	36.19±15.42	<0.001*
PB	74.27 ± 12.08	67.76 ± 10.41	71.28 ± 11.46	0.002*
PO	7.70 ± 1.62	7.55 ± 1.74	7.95 ± 1.34	0.428
PECY7	142.82± 44.30	112.06 ± 49.20	169.74 ± 45.16	<0.001*
APCY.7	592.09±116.20	606.07 ± 124.92	569.07±103.66	<0.001*

*Prueba de ANOVA. (Fuente propia)

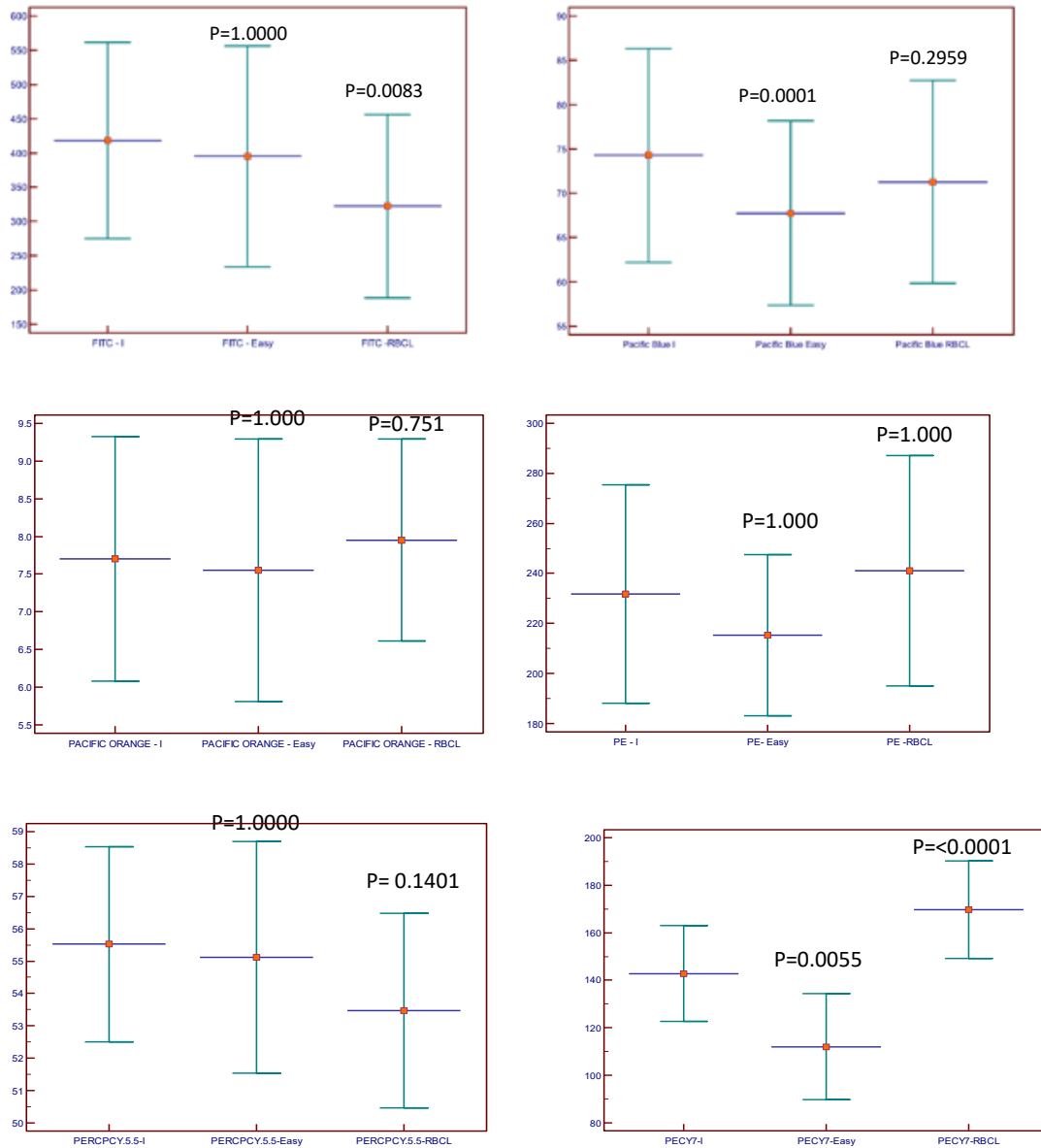
Tabla 13: Prueba de Bonferroni de resolución de fluorescencia.

Factors		Mean difference	Std. Error	P ^a	95% CI ^a
APC - EI	- EE	-1.261	1.269	0.9965	-4.577 a 2.055
	- RBCL	-6.273	1.101	<0.0001	-9.151 a -3.396
FITCE -I	- EE	23.489	40.846	1.0000	-83.225 a 130.203
	- RBCL	96.435	28.268	0.0083	22.581 a 170.288
PACIFIC_ORANGE-EI	- EE	0.152	0.419	1.0000	-0.943 a 1.247
	- RBCL	-0.251	0.212	0.7519	-0.806 a 0.304
Pacific_Blue_EI	- EE	6.507	1.211	0.0001	3.342 a 9.672
	- RBCL	2.984	1.722	0.2959	-1.516 a 7.484
APCY.7-EI	- EE	-13.985	4.929	0.0306	-26.863 a -1.107
	- RBCL	23.026	6.968	0.0106	4.820 a 41.231

PECY7_I	- PEY7_Easy	30.755	8.577	0.0055	8.348 to 53.163
	- PEY7_RBCL	-26.920	4.550	<0.0001	-38.807 to -15.033
PE_I	- PE_Easy	16.458	18.099	1.0000	-30.827 to 63.744
	- PE_RBCL	-9.334	13.403	1.0000	-44.349 to 25.682
PERPCY.5.5_I	- PERPCY.5.5_Easy	0.403	1.008	1.0000	-2.230 to 3.037
	- PERPCY.5.5_RBCL	2.054	0.969	0.1401	-0.477 to 4.586

*Prueba de Bonferroni. (fuente propia)

Figura 6: Comparación de promedios y desviación estándar de la resolución de las fluorescencias con los 3 lisantes evaluados.



Se analizaron los promedios y DS de las resoluciones entre poblaciones en las 8 fluorescencias, tratadas con los 3 lisantes. En la evaluación con ANOVA no se encontró diferencia significativa entre las resoluciones de las poblaciones evaluadas en los fluorocromos PE, PerCP-cy5.5 y PO. Sí se evidenció diferencias en FITC, APC, PB, PEcy7, por lo cual se realizó el análisis por pares con la de Bonferroni, Obteniéndose como resultado que en APC y FITC hubo similitud entre EI y EE.

Por otro lado, se encontró que con EI se obtuvieron las mayores resoluciones de fluorescencias de FITC y PB, con RBCL en APC y PE- Cy7 y con EE en APC-cy7.

5.2. Coeficiente de variación de los fluorocromos tratadas con los lisantes evaluados.

Tabla 14: Coeficientes de variación de los fluorocromos.

Fluorocromo (CV)	Excellyse I	Excellyse Easy	RBCL	P value *
PO	21.94± 1.54	21.33±1.62	22.77 ± 1.65	< 0.001 *
FITC	21.99 ± 3.38	20.05±2.35	24.22±5.37	0.001 *
PE	34.75 ± 4.42	34.74 ± 3.51	35.89 ± 3.86	0011 *
PerCPcy.5.5	37.52 ± 1.94	37.99 ± 2.11	37.36 ± 2.19	< 0.001 *
APC	32.75 ± 2.76	33.07±2.26	33.13 ± 1.91	0.264
PB	20.31± 1.41	19.61 ± 1.49	21.04 ± 1.58	< 0.001 *
PECY7.	51.05± 9.16	54.99 ± 10.14	51.63 ± 8.24	< 0.001 *
APCCY7	35.97 ± 6.32	38.69 ± 7.91	39.77 ± 7.69	< 0.001 *

*Prueba de ANOVA (Fuente: propia)

Tabla 15: Prueba de Bonferroni CV de los 8 fluorocromos.

		Mean difference	Std. Error	P ^a	95% CI ^a
PE – EI	EE	0.00524	0.471	1	-1.226 to 1.237
	RBCL	-1.145	0.385	0.0224	-2.150 to -0.140
APCcy7 – EI	EE	-2.713	0.485	0.0001	-3.981 to -1.444
	RBCL	-3.8	0.493	<0.0001	-5.087 to -2.513
PECy7 -EI	EE	-3.946	1.046	0.0036	-6.680 to -1.212
	RBCL	-0.58	0.775	1	-2.605 to 1.445
PerCPCy5.5-EI	EE	-0.47	0.145	0.0123	-0.848 to -0.0910
	RBCL	0.156	0.153	0.9579	-0.243 to 0.556
PO-EI	EE	0.609	0.148	0.0017	0.221 to 0.996
	RBCL	-0.824	0.128	<0.0001	-1.157 to -0.491
APC-EI	EE	-0.313	0.256	0.7087	-0.982 to 0.357
	RBCL	-0.38	0.289	0.6095	-1.135 to 0.375
FITC-EI	EE	1.947	0.393	0.0002	0.922 to 2.973
	RBCL	-2.228	0.977	0.1009	-4.780 to 0.324

PB-EI	EE	0.7	0.121	<0.0001	0.385 to 1.016
	RBCL	-0.732	0.127	<0.0001	-1.063 to -0.401

*Prueba de Bonferroni ($P < 0.05$). (Fuente: propia)

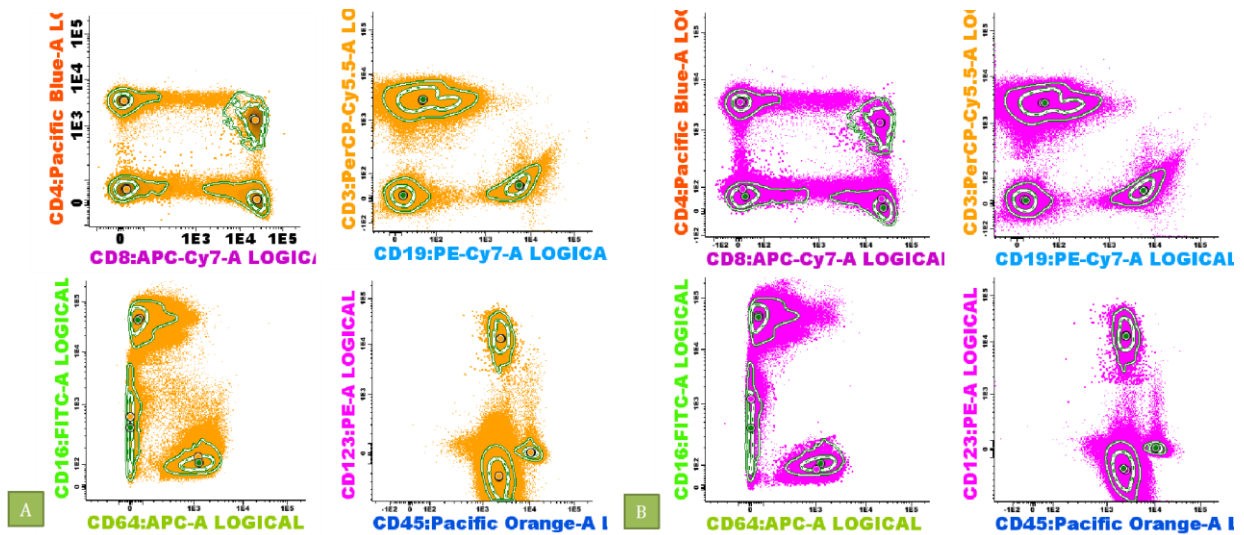
En la tabla 14 muestra promedio de coeficiente de variación (CV) y sus respectivas desviaciones estándar (DS) de los 8 fluorocromos evaluados con los tres lisantes.

La prueba de ANOVA mostró que existen similitudes en las dispersiones de los eventos únicamente en la fluorescencia de APC. En las otras 7 fluorescencias se halló diferencia significativa, por lo que se realizó la prueba Bonferroni, como se muestra en la tabla 15. En la comparación por pares se observó que las menores dispersiones en muestras tratadas con el lisante de referencia estuvieron en APC, PE-Cy7 y APC-Cy7. Con EE en PO, PB, FITC y PE, sin embargo, en PE no hubo diferencia significativa con EI. Con RBCL, la menor dispersión estuvo en PerCP-Cy5.5, sin que esto represente variación estadísticamente significativa con EI.

Estas diferencias estadísticamente significativas fueron revisadas en el análisis de gráficas de dispersión, en búsqueda de diferencias clínicas significativas. Se evaluó con el software Infinicyt, activando en las gráficas las herramientas estadísticas de líneas de Desviación Estándar y medianas.

Con los resultados se determinó que no hubo diferencia significativa, debido a que los puntos de medianas de los lisantes evaluados solapaban con los del lisante patrón, Sin embargo, sí se observó disminución de la resolución en FITC para ambos lisantes probados y en PB para RBCL, como se muestra en la gráfica 5.

Figura 7. A: curvas de 1 y 2 DS y mediana de EI en verde, comparando el solapamiento con EE en naranja. B: curvas de 1 y 2 DS y mediana de EI en verde, comparando el solapamiento con RLB en rosado.



Fuente: propia.

La gráfica 7 muestra la fusión de los 21 ficheros para cada lisante, en una comparación de solapamiento de trazados. En la sección A, se comparó EI, (líneas de 1 y 2 DS e IFM en verde) con EE (puntos e IFM en naranja) y a la derecha (B), el lisante patrón EI (líneas de DS e IFM en verde) con RBCL (puntos e IFM en rosado). En ambos casos se observó que la IFM tanto EE, como RBCL solapaban dentro de una 1DS con los trazados de EI. Excepto en el parámetro FITC, las dispersiones de las poblaciones negativas de muestras tratadas con EE evidenciaron un valor de IFM mayor que en EI y, por lo tanto, disminución de la resolución en este fluorocromo, en comparación con el patrón.

El resultado de los 3 análisis permitió concluir que los lisantes probados tienen efecto en la dispersión de algunos fluorocromos. Para los datos obtenidos con EE, en FITC si bien se halló diferencia en las gráficas esto no tuvo diferencia estadísticamente significativa, sumando a un bajo CV para la dispersión de los eventos en este fluorocromo. Contrariamente, con RBCL se encontraron diferencias gráficas y estadísticamente significativas por la disminución de resolución y el valor de CV más amplio, tanto en FITC como en PB.

Finalmente, luego de la evaluación de los 3 lisantes en el citómetro de espectro completo, la solución de lisis que demostró una buena superposición en los parámetros de dispersión FSC/SSC, permite una adecuada separación entre linfocitos y debris, con menor pérdida celular, un bajo coeficiente de variación (CV) y sin evidencia de pérdida de fluorescencia fue Excellise I.

4.1 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La Citometría de Flujo es una tecnología ampliamente utilizada para inmunofenotipificar neoplasias hematológicas. Por lo tanto, los protocolos para dichos estudios involucran el uso de cóctel de anticuerpos monoclonales y soluciones de lisis para eliminar los eritrocitos; debido a que a estos dificultan el reconocimiento de subpoblaciones de leucocitos. Por lo tanto, es importante emplear un reactivo de lisis para eliminar los glóbulos rojos y así aislar las poblaciones leucocitarias. ⁽¹²⁾

Según señalado por Flores J, (2016), todo protocolo de preparación de muestras para inmunofenotipado por Citometría de Flujo debe cumplir con los siguientes criterios: mantener la resolución entre las poblaciones leucocitarias en dispersión lateral (SSC) y dispersión frontal (FSC), mínima pérdida celular, mantener la estabilidad de los epítomos antigénicos, la intensidad de fluorescencia de los fluorocromos, mantener bajos niveles de autofluorescencia y “debris”.

En el presente estudio, se incluyó 21 muestras de sangre periférica con EDTA de donantes voluntarios para evaluar el desempeño de los lisantes para el estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo de espectro completo y se evaluaron los siguientes puntos: pérdida celular, la resolución entre linfocitos y debris, conservación de fluorescencia y sus respectivos CV, frecuencias de las poblaciones, distribuciones de las poblaciones en FSC y SSC.

En los resultados obtenidos del estudio se pudo apreciar que la pérdida de celularidad ocasionada por los 3 lisantes evaluados no tuvo diferencias significativas, lo que coincide con la investigación de Gonzales S, (2022). Mientras, se observó una disminución estadísticamente significativa en los recuentos de los leucocitos, similar a lo descrito en la publicación de Rico L. (2022). Además, otros autores indican que las soluciones de lisis de hematíes pueden generar pérdidas significativas en las subpoblaciones leucocitarias y este estaría relacionado con la centrifugación y tiempo de lisis; para ello es importante establecer un protocolo optimizado de lisis de los glóbulos rojos que sea adecuado para inmunofenotipificación por Citometría de Flujo según la recomendación de Li X, et al (2018).

En la evaluación de resolución entre linfocitos y debris el excellyse I mostró mayor discriminación con un promedio de 3.8, que coincide con los resultados obtenidos en la investigación de Gonzales S, (2022) donde el Excellyse I y Optilysis C presentaron mejor separación entre leucocitos y debris con un promedio de 5.05 y 4.58 respectivamente frente a los demás lisantes evaluados.

Cabe mencionar que el lisante utilizado como referencia, es Excellyse I. Como antecedente, el laboratorio Cytometric Bioservices estandarizó la plataforma analítica para neoplasias hematológicas comprendida por el citómetro Novocyte Advanteon en paneles de 8 colores, frente al citómetro Facs Canto II (Beckton Dickinson, San José, USA), cómo método comparador. Se obtuvo como resultado luego de la interpretación con el software Infinicyt 2.0 (Cytognos, Salamanca, España) y comparadas con la base de datos EuroflowTM reportando la concordancia de 97%, y como recomendación el uso del lisante Excellyse I en la técnica marcaje/lisado/lavado. Asimismo, esta plataforma estandarizada es controlada periódicamente, con resultados satisfactorios por la prueba de proficiencia externa del Colegio Americano de Patólogos (CAP).

En cuanto a la frecuencia leucocitaria, se observó que los monocitos, eosinófilos y basófilos presentaron diferencias significativas entre lisante patron (EI) y EE. No se observó diferencias en las poblaciones mayoritarias como neutrófilos y linfocitos y mientras que con RBCL se observó diferencias significativas en todas las poblaciones evaluadas. Lo que coincide con Gonsales,S (2022) donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las poblaciones mayoritarias, pero sí en las poblaciones minoritarias. En otras publicaciones como la de Plank.et al (2021) se describe diferencias significativas en los linfocitos y monocitos, mencionando que la pérdida en los linfocitos podría estar relacionado a los lisantes que contenga fijador con base en formaldehído; sin embargo, se observó que algunas soluciones que contenían formaldehído no inducen a la pérdida de linfocitos, por lo tanto, no se relaciona la pérdida celular selectiva con este componente específico. Estos últimos datos se suman a lo publicado por Rico L, et al (2022), mencionando que las soluciones de lisis de hematíes causan no solo una pérdida significativa de células dendríticas, sino también de basófilos y las demás poblaciones leucocitarias. En cuanto a las células dendríticas, pueden deberse a que estas poblaciones de forma estrellada parecen muy lábiles. La variabilidad en las frecuencias de poblaciones

minoritarias pueden deberse a su baja presencia dentro de los leucocitos y en las poblaciones en general también estarían influenciada por diversas condiciones propias en la ejecución del procedimiento; como la técnica de uso del instrumento para la aspiración y eliminación del sobrenadante (instrumento para la aspiración usado para los lavados de las muestras), la centrifugación y conservación del volumen residual remanente antes de la resuspensión del botón leucocitario, además de la experiencia y destreza del operador.

Los efectos de los lisantes en el tamaño y complejidad celular, por ende, sobre la dispersión en FSC y SSC, en el estudio se observó diferente superposición de las poblaciones por cada lisante evaluado. En el lisante RBCL se describe que en cuanto a tamaño se comprime a los neutrófilos y monocitos; mientras el lisante Excellyse Easy muestra una distribución más amplia en SSC para los monocitos. Estos hallazgos fueron reportados similarmente por Pan Q, et.al., (2014) que los lisantes pueden influir en las propiedades de dispersión de luz de los leucocitos y observó dispersión amplia en linfocitos, monocitos y en los granulocitos. También Plank et al (2021) y Rico et al (2022) observaron en las poblaciones en FSC y SSC diferencias entre los métodos de lisis sobre las propiedades de dispersión de la luz de los diferentes grupos celulares.

En la evaluación de las fluorescencias de los fluorocromos, se observó diferencia significativa en PB y FITC, mientras según Gonsales,S (2022), se observó diferencia significativa en PE y APC, la disminución de la intensidad de fluorescencia podría estar relacionado a los lavados y fijación con formaldehído según Flores J (2016). Son pocos estudios que informan datos que se puedan comparar directamente con los resultados presentados en el presente estudio.

Einwallner. et al (2013) enfatiza la importancia de la evaluación y armonización de los protocolos de lisis de glóbulos rojos para aplicación de citometría de flujo en neoplasias hematológicas.

V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.1 CONCLUSIONES

- Es posible la selección de una solución de lisis de hematíes para estudios de inmunofenotipificación por citometría de flujo de espectro completo.
- Todos los lisantes evaluados no mostraron diferencias estadísticamente significativas, con respecto a la pérdida celular. Por lo cual, respecto a este parámetro evaluado se considera que los tres lisantes tienen desempeño semejante.
- Se evidenció que el lisante Excellyse I fue que demostró mejor separación entre linfocitos con respecto a debris en las muestras evaluadas posterior a la lisis frente a los demás lisantes.
- El lisante Excellyse I conservó la intensidad de fluorescencia media y presentó mejor desempeño en la resolución de los fluorocromos frente a los demás lisantes evaluados, es importante que un lisante mantenga las intensidades de fluorescencia media de los fluorocromos y la resolución; ya que eso, permite diferenciar células normales de patológicas o atípicas, para una interpretación objetiva de una población de acuerdo con las expresiones antigénicas que presenta cada célula.
- El lisante Excellyse I y Excellyse Easy no afectaron las frecuencias en las poblaciones mayoritarias; sin embargo, el lisante RBC Lysis Buffer afectó a toda la población. La población minoritaria afectada por los 3 lisantes, puede deberse a la baja frecuencia de esta población.
- El lisante que demostró una mejor distribución de las poblaciones en FSC y SSC fue Excellyse I frente a los demás lisantes evaluados.
- Se concluye que el uso de lisante Excellyse I es favorable porque permite mejor separación entre los linfocitos y debris, conserva las intensidades de fluorescencia media y mejor resolución de los fluorocromos y demostró una dispersión adecuada en FSC y SSC para la separación de leucocitos, según las gráficas de referencia establecidas por la estandarización previa del laboratorio. Además, facilita el análisis manual por el operador, al presentar los eventos distribuidos

con menor dispersión alrededor del IFM tanto en FSC como en SSC. Por último, se concluye sobre el análisis en la evaluación de los tres lisantes, que Excellyse I tiene un buen desempeño en protocolos de marcaje de antígenos de superficie (incluye lisis de hematíes y lavados por centrifugación) para el citómetro de flujo de espectro completo Northern Lights 3000-CLC.

1.1 RECOMENDACIONES

- Para futuras investigaciones, se sugiere evaluar lisantes para protocolos sin lavado para recuentos de subpoblaciones linfocitarias y células progenitoras CD34 +.
- Es importante asegurar que una solución lisante mantenga las proporciones de poblaciones, en el estudio de neoplasias hematológicas. Ante ello, la sugerencia es establecer un punto crítico para la determinación de grupos celulares de baja frecuencia, en muestras con poblaciones heterogéneas.
- Además, se sugiere ampliar el estudio con respecto a los tiempos de conservación después del proceso, con el fin de evaluar la viabilidad de las poblaciones celulares por el paso de tiempo.
- Finalmente, se recomienda como una buena práctica de los laboratorios clínicos realizar la verificación de lisantes e insumos, con el propósito de reducir los riesgos que afectan a los grupos celulares en FSC y SSC, así como reducir la resolución entre los leucocitos. Siendo el proceso y los procedimientos de marcaje, actividades dependientes del operador (no automatizado), es importante recomendar el énfasis hacia la experticia y capacitación del personal, a fin de no afectar los resultados.

REFERENCIAS

1. Niewold P, Ashhurst TM, Smith AL, King NJC. Evaluating spectral cytometry for immune profiling in viral disease. *Cytometry A*. noviembre de 2020;97(11):1165-79.
2. HIGH THROUGHPUT FLOW CYTOMETRY [Internet]. SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN. 2021 [citado 14 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://saishnp.com/2021/02/05/high-throughput-flow-cytometry/>
3. Rico LG, Salvia R, Juncà J, Ward MD, Bradford JA, Sorigue M, et al. Erythrocyte lysing solutions have a detrimental effect in flow cytometric dendritic cell detection. *Cytometry A*. 20 de octubre de 2022;cyto.a.24696.
4. O'Donahue M y Johnson L. Lysing Methods and Reagents for Flow Cytometry Immunophenotyping. 2016 [consultado 5 de diciembre de 2022] Disponible en: <https://www.cytometry.org/webmodules/module1.pdf>.
5. Petriz J, Bradford JA, Ward MD. No lyse no wash flow cytometry for maximizing minimal sample preparation. *Methods*. febrero de 2018;134-135:149-63.
6. Pérez-Lara JC, Santiago-Cruz W, Romero-Ramírez H, Rodríguez-Alba JC. Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. *Rev Médica Univ Veracruzana*. 25 de febrero de 2019;18(2):41-52.
7. Glier H, Heijnen I, Hauwel M, Dirks J, Quarroz S, Lehmann T, et al. Standardization of 8-color flow cytometry across different flow cytometer instruments: A feasibility study in clinical laboratories in Switzerland. *J Immunol Methods*. diciembre de 2019;475:112348.
8. Gonzales,. Estandarización del citómetro de flujo Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos en un laboratorio privado de Lima, 2021 [Internet] [Tesis]. [Lima-Perú]: UNMSM; 2022. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/18723/Gonz%c3%a1les_ss.pdf?sequence=1&isAllowed=y
9. Plank K, Dorn C, Krause SW. The effect of erythrocyte lysing reagents on enumeration of leukocyte subpopulations compared with a no-lyse-no-wash protocol. *Int J Lab Hematol*. octubre de 2021;43(5):939-47.
10. Solly F, Angelot-Delettre F, Ticchioni M, Geneviève F, Rambaud H, Baseggio L, et al. Standardization of Flow Cytometric Immunophenotyping for Hematological Malignancies: The FranceFlow Group Experience. *Cytometry A*. septiembre de 2019;95(9):1008-18.
11. Li X, Tao Y, Liu J, Lu W, Liu H, Dai J. Optimized protocol of RBCs lysis for immunophenotypic analysis in the peripheral blood of tree shrew. *Acta Biochim Biophys Sin*. 1 de febrero de 2018;50(4):428-31.

12. Pan Q, Ye L, Deng Z, Li L, Liu H. Effects of Red Blood Cell Lysing Solutions on the Detection of Peripheral Basophils of Healthy Normals and Sle Patients by Flow Cytometry. *J Immunoassay Immunochem.* 2 de octubre de 2014;35(4):368-77.
13. on behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708), Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia.* septiembre de 2012;26(9):1986-2010.
14. Einwallner E, Subasic A, Strasser A, Augustin D, Thalhammer R, Steiner I, et al. Lysis matters: Red cell lysis with FACS Lyse affects the flow cytometric enumeration of circulating leukemic blasts. *J Immunol Methods.* abril de 2013;390(1-2):127-32.
15. Manohar SM, Shah P, Nair A. Flow cytometry: principles, applications and recent advances. *Bioanalysis.* febrero de 2021;13(3):181-98.
16. Flores-Montero J. Nuevas estrategias metodológicas y de análisis de datos de citometría de flujo aplicadas al diagnóstico y clasificación de las hemopatías malignas. [Tesis Doctoral]. [España]: Universidad Salamanca; 2016.
17. [muv182d.pdf](#) [Internet]. [citado 22 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2018/muv182d.pdf>
18. Lopez P, Orfao A, Overton WR, Pursley SW, Ransom J, Sharpe J, et al. Christina Jespersgaard, PhD. :130.
19. Spectral Flow Cytometry Fundamentals - PE [Internet]. [citado 20 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/ht/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-learning-center/flow-cytometry-resource-library/flow-cytometry-methods/spectral-flow-cytometry-fundamentals.html>
20. Cytometry Pt A - 2020 - Park - OMIP-069 Forty-Color Full Spectrum Flow Cytometry Panel for Deep Immunophenotyping of Major.pdf.
21. Flores Montero JA. Nuevas estrategias metodológicas y de análisis de datos de citometría de flujo aplicadas al diagnóstico y clasificación de las hemopatías malignas [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universidad de Salamanca; 2016 [citado 14 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=79712>
22. Marrero YT. Aplicaciones de la citometría de flujo en el estudio de los síndromes linfoproliferativos crónicos. :21.
23. Kalina T. Reproducibility of Flow Cytometry Through Standardization: Opportunities and Challenges. *Cytometry A.* febrero de 2020;97(2):137-47.
24. [pdp](#) [Internet]. [citado 17 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://wwwbdbiosciences.com/en-us/products/reagents/flow-cytometry-reagents/clinical-diagnostics/buffers-and-supporting-reagents-ivd-ce-ivd/lysing-solution-10x-concentrate.349202>

25. J. Petriz, JA Bradford, MD Ward, Citometría de flujo sin lisis y sin lavado para maximizar la preparación mínima de muestras, *Métodos*(2017), doi:<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.12.012>.
26. Module1_Revised.pdf [Internet]. [citado 1 de diciembre de 2022]. Disponible en: https://www.cytometry.org/web/modules/Module1_Revised.pdf
27. on behalf of the EuroFlow Consortium, van Dongen JJM, Orfao A. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia*. septiembre de 2012;26(9):1899-907.
28. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. marzo de 2012;12(3):191-200.
29. Dworzak MN, Buldini B, Gaipa G, Ratei R, Hrusak O, Luria D, et al. AIEOP-BFM Consensus Guidelines 2016 for Flow Cytometric Immunophenotyping of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: iBFM-FLOW STANDARDS FOR IMMUNOPHENOTYPING OF PEDIATRIC ALL. *Cytometry B Clin Cytom*. enero de 2018;94(1):82-93.
30. Estudios inmunofenotípicos de las células hematopoyéticas [Internet]. [citado 30 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://empendium.com/manualmibe/tratado/social/chapter/B76.VI.C.7>.
31. Sanjuán FJM. Economipedia. [citado 30 de marzo de 2023]. Coeficiente de variación. Disponible en: <https://economipedia.com/definiciones/coeficiente-de-variacion.html>
32. Extensión de archivo FCS : ¿Qué es? ¿Cómo abrir un archivo FCS? [Internet]. [citado 30 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://filext.com/es/extension-de-archivo/FCS>
33. Westreicher G. Economipedia. [citado 19 de noviembre de 2022]. Método deductivo. Disponible en: <https://economipedia.com/definiciones/metodo-deductivo.html>
34. Indeed Career Guide [Internet]. [citado 17 de marzo de 2023]. Basic vs. Applied Research: Definitions and Examples. Disponible en: <https://ca.indeed.com/career-advice/career-development/basic-vs-applied-research>
35. Hernández S y Mendoza T. Metodología de la Investigación Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta Interamericana MH, editor.; 2018..pdf.
36. Otzen T, Manterola C. Técnicas de Muestreo sobre una Población a Estudio. *Int J Morphol*. marzo de 2017;35(1):227-32.
37. Chow S, Hedley D, Grom P, Magari R, Jacobberger JW, Shankey TV. Whole blood fixation and permeabilization protocol with red blood cell lysis for flow cytometry of intracellular phosphorylated epitopes in leukocyte subpopulations. *Cytometry A*. septiembre de 2005;67A(1):4-17.

38. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Validation of Assays Performed by Flow Cytometry. 1st ed. CLSI guideline H62. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2019.

ANEXOS.

Anexo n°1. PROTOCOLO PARA SELECCIÓN DE LISANTES.

Se evaluará 21 muestras de sangre de donantes voluntarios sanos siguiendo los siguientes protocolos:

Estudio de Inmunofenotipo:

1. En un tubo se coloca el cóctel de anticuerpos.

Fluorocromo	PO	PB	FITC	PE	PerCp - Cy5.5	PE-cy7	APC	APC- cy7	PBS	Vol final
Anticuerpo	CD4 5	CD4	CD16	CD12 3	CD3	CD19	CD64	CD8	-	
Volumen	4ul	2ul	2ul	5ul	1ul	1ul	2ul	2ul	1ul	20 ul
Marca	Exbio	Exbio	Exbio	Exbio	Exbio	Exbio	Exbio	Exbio		

Tabla 1. Anticuerpos con fluorocromos, marca y volúmenes utilizado para el marcaje de muestras de sangre periférica.

2. Luego de agrega 200ul de muestra.
3. Mezclar por vórtex por 6 segundos.
4. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente a la oscuridad.
5. Después de incubación se reparte la muestra a 4 tubos la cantidad 55ul por pipeteo normal.
6. Se agrega solución de lisis diferente a cada tubo, el volumen se agrega de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
7. Mezclar por vórtex e incubar de acuerdo con los protocolos del fabricante.
8. Luego finalizado el proceso de lisis, continuar los lavados de acuerdo con las recomendaciones del inserto de cada solución de lisis. (Anexo 2,3 y 4).

EXCELLYSE Easy

Cat.No. ED7066

1. Intended purpose

Intended use

The EXCELLYSE Easy lysing solution is intended for red blood cell lysis following antibody staining of human peripheral blood leukocytes.

The lysing solution is appropriate for use with EXBIO single colour monoclonal antibodies and KOMBITEST reagents and may be used in both lyse/wash and lyse/no wash protocol.

Context of a physiological or pathological state

Leukocyte analysis and detection in peripheral blood requires elimination of interfering cells, mainly erythrocytes. Ficol density gradient method is usually used to separate leukocytes from whole blood. This method is rather time consuming and may lead to a loss of certain leukocyte subsets. Direct blood sample staining followed by red blood cell lysis therefore takes place in clinical laboratories as a fast and accurate method for whole blood flow cytometry analysis.

2. Test principle

The peripheral whole blood specimen is stained with reagent containing specific monoclonal antibodies labeled with fluorochrome dyes. The antibodies in the reagent bind specifically to leukocyte surface antigens. The stained specimen is then treated with the EXCELLYSE Easy lysing solution, which lyses red blood cells under hypotonic conditions and preserves the monoclonal antibody stained leukocytes for further flow cytometry analysis.

3. Reagents provided

The content of the vial (100 ml) is sufficient for 1000-2000 tests, respectively. The lysing solution is a 10x concentrated and must be diluted 10x with deionized water prior to use (1 volume of concentrated solution with 9 volumes of deionized water).

4. Materials required but not provided

Material necessary for collection of peripheral blood
 Suitable 5ml test tubes for blood staining (e.g. 12 x 75 mm)
 Phosphate buffered saline (PBS)
 Deionized water
 Appropriate fluorescent-dye-labeled primary/secondary antibody

5. Equipment required

Automatic pipettes with disposable tips
 Vortex mixer
 Centrifuge
 Flow cytometer

6. Storage and handling

10x concentrated EXCELLYSE Easy store at 2-25 °C. The prepared solution (1x concentrated) is stable for 1 month when stored at room temperature.

7. Warnings, precautions and limitations of use

- Intended for In Vitro Diagnostic use in laboratories outside USA and Canada. This CE-IVD kit is in conformity with the European Directive 98/79/EC.
- Do not use the reagent after its expiration date.
- Do not use if any discoloration or precipitation occurs.
- Do not freeze.
- Avoid reagents contamination.
- Any non-performance of lysing protocol may produce false results.
- Blood samples are considered as potentially infectious and must be handled with care. Avoid all contact of the sample with the skin, eyes and mucosa.
- The reagent contains formaldehyde, methanol and diethylene glycol.

- H-phrases
 H302: Harmful if swallowed.
 H315: Causes skin irritation.
 H317: May cause an allergic skin reaction.
 H319: Causes serious eye irritation.
 H335: May cause respiratory irritation.
 H341: Suspected of causing genetic defects.
 H350: May cause cancer.
 H373: May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure.

- clothing/eye protection/face protection.
 P301 + P312: IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.
 P302 + P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
 P332+P313: If skin irritation occurs: Get medical advice/attention
 P304+P340: IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing
 P305 + P351 + P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
 P501: Dispose of contents/container to authorized facility for dangerous wastes.

- Red blood cells from abnormal patients may be resistant to lysis using lysing solutions.
- Flow cytometer may produce false results if the device has not been aligned and maintained appropriately.
- Data may be incorrectly interpreted if fluorescent signals were compensated wrongly or if gates were positioned inaccurately.
- Blood samples from abnormal patients may exhibit abnormal values of positive cells.

8. Specimen

The specimen shall be a human, peripheral whole blood. Blood must be collected into a tube containing an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA). Collected blood sample has to be retained in collection tube prior to staining and lysing. Refer to the antibody reagent IFU for storage restrictions after collection.

9. Procedure

Lyse/no wash lysing protocol

- Collect peripheral blood in a sterile tube with an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA).
- Follow instructions for whole blood antibody staining.
- Add 450 µl of diluted lysing solution per 50 µl of whole blood. Mix the tube with a vortex mixer.
- Incubate for about 5-10 minutes, until the blurry blood sample solution becomes clear.
- Analyze the sample immediately using flow cytometer or store the sample at 2-8°C in the dark and analyze within 24 hours. No further cell fixation is required. See figures 1 and 2 for example data.

Fig. 1: Peripheral blood leukocytes dot plot from lysed/non-washed whole blood.

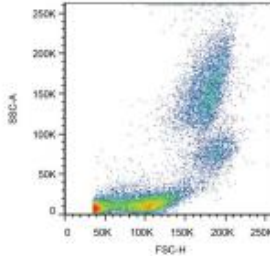
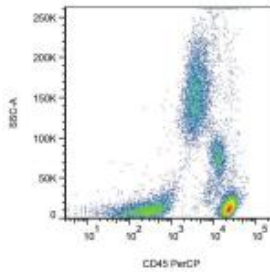


Fig. 2: Identification of CD45+ lymphocyte population in lysed/non-washed whole blood stained with anti-CD45 antibody.



- per 50 µl of whole blood. Mix the tube with a vortex mixer.
- Incubate for about 5-10 minutes, until the blurry blood sample solution becomes clear.
 - Centrifuge the tube for 5 minutes at 300 g.
 - Remove supernatant and resuspend the pellet with 0.2 - 0.5 ml of PBS.
 - Analyze the sample immediately using flow cytometer or store the sample at 2-8 °C in the dark and analyze within 24 hours. No further cell fixation is required. See Figures 3 and 4 for example data.

Fig. 3: Peripheral blood leukocytes dot plot from lysed/washed whole blood.

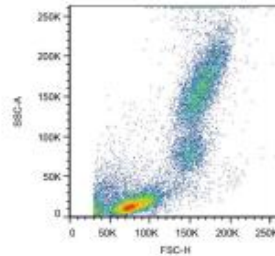
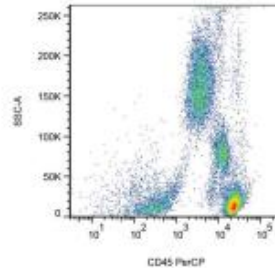


Fig. 4: Identification of CD45+ lymphocyte population in lysed/washed whole blood stained with anti-CD45 antibody.



10. Analytical performance

Repeatability and reproducibility

Test of sample repeatability, for reagent KOMBITEST CD3 FITC/CD16+CD56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC, was performed at one clinical site. Measurements were made on single blood sample in 12 test tubes in parallel. Coefficients of variation (CV) are given in the table below.

Lymphocyte subset	n	Average	SD	CV
% CD3+	12	47.4	0.98	2.06
% CD16+CD56+	12	32.9	0.58	1.75
% CD19+	12	17.3	0.64	3.68

Test of sample reproducibility, for reagent KOMBITEST CD3 FITC/CD16+CD56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC, was performed at one clinical site. Measurements were made on stabilized blood sample (Immuno-Trell™ Cells, Beckman-Coulter) under the same conditions within time frame of 21 days. Coefficients of variation (CV) are given in the table below.

Lymphocyte subset	n	Average	SD	CV
% CD3+	42	72.7	0.96	1.32
% CD16+CD56+	42	11.1	0.86	7.78
% CD19+	42	14.9	0.82	5.48

11. Clinical performance

n/a

12. References

n/a

13. Manufacturer

EXBIO Praha, a.s.
 Nad Šafínou II 341
 25250 Vestec
 Czech Republic

14. Trademarks

n/a

15. Revision History

- Version 1, ED7066_IFU_v1 Initial Release
- Version 2, ED7066_IFU_v2 GHS symbols, H- and P- phrases introduced.
- Version 3, ED7066_IFU_v3 Registered trademark issued to EXCELLYSE®, Manufacturer postal code changed from 25242 to 25250.
- Version 4, ED7066_IFU_v4 The smaller version of the product (30 ml vial) is no longer produced and thus mentioned in IFU. H- and P- phrases revised.
- Version 5, ED7066_IFU_v5 The company logo changed. IFU layout changed. Registered trademark removed from EXCELLYSE.
- Version 6, ED7066_IFU_v6 Product Use Limitation text was refined.

EXCELLYSE I

Cat.No. ED7065

1. Intended purpose

Intended use

The EXCELLYSE I lysing solution is intended for red blood cell lysis following antibody staining of human peripheral blood leukocytes.

The lysing solution is appropriate for use with EXBIO single colour monoclonal antibodies and KOMBITEST reagents and may be used in both lyse/wash and lyse/no wash protocol.

Context of a physiological or pathological state

Leukocyte analysis and detection in peripheral blood requires elimination of interfering cells, mainly erythrocytes. Ficoll density gradient method is usually used to separate leukocytes from whole blood. This method is rather time consuming and may lead to a loss of certain leukocyte subsets. Direct blood sample staining followed by red blood cell lysis therefore takes place in clinical laboratories as a fast and accurate method for whole blood flow cytometry analysis.

2. Test principle

n/a

3. Reagents provided

The content of the vial [100 ml] is sufficient for 500 - 1000 tests. The lysing solution is ready to use.

4. Materials required but not provided

Material necessary for collection of peripheral blood

Suitable 5ml test tubes for blood staining (e.g. 12 x 75 mm)

Phosphate buffered saline (PBS)

Deionized water

Appropriate fluorescent-dye-labeled primary/secondary antibody

5. Equipment required

Automatic pipettes with disposable tips

Vortex mixer

Centrifuge

Flow cytometer

6. Storage and handling

Store the EXCELLYSE I at 2-25 °C.

7. Warnings, precautions and limitations of use

- Intended for In Vitro Diagnostic use in laboratories outside USA and Canada. This CE-IVD kit is in conformity with the European Directive 98/79/EC.
- Do not use the reagent after its expiration date.
- Do not use if any discoloration or precipitation occurs.
- Do not freeze.
- Avoid reagents contamination.
- Blood samples are considered as potentially infectious and must be handled with care. Avoid all contact of the sample with the skin, eyes and mucosa.
- The reagent contains formaldehyde and methanol.
 - H-phrases
 - H302+H312+H332: Harmful if swallowed, in contact with skin or if inhaled.
 - H317: May cause an allergic skin reaction.
 - H351: Suspected of causing cancer.
 - P-phrases
 - P270: Do not eat, drink or smoke when using this product.
 - P280: Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection.
 - P301+P312: IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.
 - P302+P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
 - P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
 - P501: Dispose of contents/container to authorized facility for dangerous wastes.
- See product Safety Data Sheet for full information on the potential hazards and how to work safely with the product.
- The flow cytometer should be calibrated on a routine basis using fluorescent microbeads to ensure stable sensitivity of detectors.
- Any non-performance of lysing protocol may produce false results.

8. Specimen

Collect peripheral blood in a sterile tube with an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA).

9. Procedure

Lyse/no wash lysing protocol

- Collect peripheral blood in a sterile tube with an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA).
- Follow instructions for whole blood antibody staining.
- Add 100 µl of lysing solution per 50 µl of whole blood. Mix the tube with a vortex mixer.
- Incubate for about 2-5 minutes at room temperature.
- Add 1 ml of deionized water to the tube, mix well, and incubate for about 5-10 minutes, until the blurry blood sample solution becomes clear.
- Analyze the sample immediately using flow cytometer or store the sample at 2-8°C in the dark and analyze within 24 hours. No further cell fixation is required. See figures 1 and 2 for example data.

Fig. 1: Peripheral blood leukocytes dot-plot from lysed/non-washed whole blood, analyzed on BD FACSCanto™ cytometer.

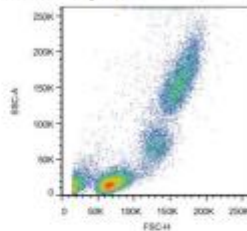
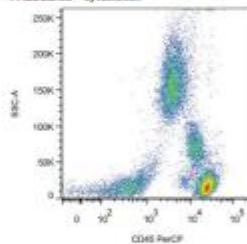


Fig. 2: Identification of CD45+ lymphocyte population in lysed/non-washed whole blood stained with anti-CD45 antibody, analyzed on BD FACSCanto™ cytometer.



Lyse/wash lysing protocol

- Collect peripheral blood in a sterile tube with an anticoagulant (e.g. Heparin, EDTA).
- Follow manufacturer's instructions for whole blood antibody staining.
- Add 100 µl of lysing solution per 50 µl of whole blood. Mix the tube with a vortex mixer.
- Incubate for about 2-5 minutes at room temperature.
- Add 2-3 ml of deionized water to the tube, mix well, and incubate for about 5-10 minutes, until the blurry blood sample solution becomes clear.
- Centrifuge the tube for 5 minutes at 300 g.
- Remove supernatant and resuspend the pellet with 0.2 - 0.5 ml of PBS.
- Analyze the sample immediately using flow cytometer or store the sample at 2-8 °C in the dark and analyze within 24 hours. No further cell fixation is required. See Figures 3 and 4 for example data.

Fig. 3: Peripheral blood leukocytes dot-plot from lysed/washed whole blood, analyzed on BD FACSCanto™ cytometer.

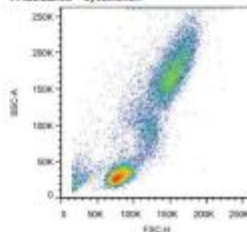
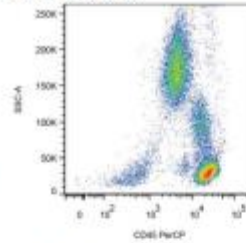


Fig. 4: Identification of CD45+ lymphocyte population in lysed/washed whole blood stained with anti-CD45 antibody, analyzed on BD FACSCanto™ cytometer.



10. Analytical performance

Precision (repeatability and reproducibility)

Repeatability was estimated by enumeration of leukocyte subsets in a single blood sample with KOMBITEST CD3 FITC/CD16+56 PE and KOMBITEST CD3 FITC/ CD19 PE (both EXBIO Praha). Measurements were repeated 10 times during one day using the same blood sample.

Lymphocyte Subset	n	Mean	SD	CV(%)
% CD3 ⁺	10	47.4	0.98	2.1
% CD16 ⁺ CD56 ⁺	10	32.9	0.58	1.8
% CD19 ⁺	10	17.3	0.64	3.7

Reproducibility was estimated by enumeration of leukocyte subsets in Immuno-Troll™ Cells (Beckman Coulter) with KOMBITEST CD3 FITC/CD16+56 PE and KOMBITEST CD3 FITC/ CD19 PE (both EXBIO Praha). Measurements were performed 14 times during one month using the same LOT of Immuno-Troll™ cells.

Lymphocyte Subset	n	Mean	SD	CV(%)
% CD3 ⁺	14	72.8	1.94	2.7
% CD16 ⁺ CD56 ⁺	14	11.7	0.87	7.4
% CD19 ⁺	14	13.2	1.16	8.8

11. Clinical performance

n/a

Interfering substances and limitations

Red blood cells from abnormal patients may be resistant to lysis using lysing solutions. Flow cytometer may produce false results if the device has not been aligned and maintained appropriately. Data may be incorrectly interpreted if fluorescent signals were compensated wrongly or if gates were positioned inaccurately. Blood samples from abnormal patients may exhibit abnormal values of positive cells.

12. References

n/a

13. Manufacturer

EXBIO Praha, a.s.
Nad Šafranou II 341
25250 Vestec
Czech Republic

info@exbio.cz

technical@exbio.cz

orders@exbio.cz

www.exbio.cz

14. Trademarks

n/a

15. Revision History

- Version 1, ED7065_IFU_v1 Initial Release
- Version 2, ED7065_IFU_v2 GHS symbols, H- and P- phrases introduced.
- Version 3, ED7065_IFU_v3 Registered trademark issued to EXCELLYSE™. Manufacturer postal code changed from 25242 to 25250.
- Version 4, ED7065_IFU_v4 The smaller version of the product (30 ml vial) is no longer mentioned.
- Version 5, ED7065_IFU_v5 The company logo changed. IFU layout changed. Analytical performance data added. Registered trademark removed from EXCELLYSE.
- Version 6, ED7065_IFU_v6 Product Use Limitation text was refined.

RBC Lysing Protocol

RBC Lysis Buffer (10X) Cat. No. TNB-4300-L100

Other Materials Required

- Flow Cytometry Staining Buffer (Stain Buffer) (1X PBS with 2% FBS, 0.09% Na-Azide)

Note: This protocol applies to human whole blood preparations. For use with other tissue samples, it is recommended that the investigator optimize conditions to obtain best results. RBC Lysis Buffer (10X) has been tested using blood collected with either heparin or EDTA as the anti-coagulant and found to perform equivalently.

1. Prepare 1X RBC Lysing Buffer by adding 1 part RBC Lysing Buffer (10X) with 9 parts room temperature distilled water.
 2. Aliquot a sample of whole blood, typically 50-100 μ L, to tube.
 3. Add fluorochrome-labeled antibodies for staining directly to sample and mix thoroughly.
 4. Incubate for 30 minutes at room temperature and protected from light.
 5. Add 2 mL of room temperature 1X RBC Lysing Buffer (prepared in step 1) and pulse vortex (<5 seconds).
 6. Incubate for 10-15 minutes at room temperature and protected from light.
 7. Centrifuge cells at 500 x g for 5 minutes at room temperature.
 8. Carefully decant supernatant and wash cells once with 1-2 mL Stain Buffer.
 9. Centrifuge cells as in Step 7 and resuspend at the appropriate volume for analysis.
-

Anexo n°5: Formato de Consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Institución: Universidad Privada Norbert Wiener

Investigador: Huamanyalli Villar Elizabeth

Título: EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LISANTES PARA EL ESTUDIO DE INMUNOFENOTIPO POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE ESPECTRO COMPLETO EN SANGRE PERIFERIC EN UN LABORATORIO PRIVADO, LIMA -2023.

Propósito del estudio

Usted ha sido invitado a participar en un estudio llamado: “EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LISANTES PARA EL ESTUDIO DE INMUNOFENOTIPO POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE ESPECTRO COMPLETO EN SANGRE PERIFERIC EN UN LABORATORIO PRIVADO, LIMA -2023”. Este es un estudio de investigación realizada por: Bach. Elizabeth Huamanyalli Villar de la Universidad Privada Norbert Wiener, para obtener el de Lic. en Tecnología Médica.

El propósito de este estudio es seleccionar la solución lisante con mejor desempeño para estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo espectro completo en un laboratorio privado de Lima-2023. Para lo cual necesitamos 21 muestras de sangre periférica de donantes voluntarios sanos.

Su ejecución permitirá implementar protocolos con uso de solución lisante adecuado para los estudios de neoplasias hematológicas por citometría de flujo de espectro completo.

Procedimientos

Si usted decide participar en este estudio, se le realizará lo siguiente:

- Se solicitará acercarse al área de toma de muestra del laboratorio Cytometric Bioservices S.A.C.
- Luego se procederá con el proceso de toma de muestra, lo cual será recolectado un tubo con anticoagulante EDTA la cantidad 3ml, mediante punción venosa del brazo.

La extracción de muestra es rápida y no se demorará más de 5 minutos.

Riesgos: Ninguno.

Beneficios por participar: No tendrá ningún beneficio alguno, pero con su muestra de sangre ayudará realizar un estudio para seleccionar una solución de lisis de hematíes con mejor desempeño para estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo espectro completo.

Costos e incentivos

Usted no deberá pagar nada por la participación. Tampoco recibirá ningún incentivo económico ni medicamentos a cambio de su participación.

Confidencialidad

Nosotros guardaremos la información con códigos y no con nombres. Si los resultados de este estudio son publicados, no se mostrará ninguna información que permita su identificación. Sus archivos no serán mostrados a ninguna persona ajena al estudio.

Derechos del paciente

Si usted se siente incómodo durante la toma de muestra, podrá retirarse de este en cualquier momento, o no participar en una parte del estudio sin perjuicio alguno. Si tiene alguna inquietud o molestia, no dude en preguntar al personal del estudio. Puede comunicarse con el (Elizabeth Huamanyalli Villar- Cel: 998877139) o al comité que validó el presente estudio, Comité de Ética para la investigación de la Universidad Norbert Wiener, telf: 7065555 anexo 3285. E-mail: comite.etica@uwiener.edu.pe

I. DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

He leído la hoja de información del Formulario de Consentimiento Informado (FCI), y declaro haber recibido una explicación satisfactoria sobre los objetivos, procedimientos y finalidades del estudio. Se han respondido todas mis dudas y preguntas. Comprendo que mi decisión de participar es voluntaria y conozco mi derecho a retirar mi consentimiento en cualquier momento, sin que esto me perjudique de ninguna manera. Recibiré una copia firmada de este consentimiento.

_____ (Firma)

Participante:

DNI:

Fecha: (dd/mm/aaaa)

_____ (Firma)

Investigador: Elizabeth Huamanyalli

DNI:46793790

Fecha: (dd/mm/aaaa)

_____ (Firma)

Nombre testigo o representante legal:

DNI:

Fecha: (dd/mm/aaaa)

Nota: La firma del testigo o representante legal es obligatoria solo cuando el participante tiene alguna discapacidad que le impida firmar o imprimir su huella, o en el caso de no saber leer y escribir.

Anexo n° 6. Instrumentos.

1.- Pérdida de celularidad.

PERDIDA DE CELULARIDAD							
Muestras	CITOMETRIA DE FLUJO						
	HEMOGRAMA	RBC Lysis Buffer	Pérdida celular	EXCELLYSE EASY	Pérdida celular	EXCELLYSE I	Pérdida celular
	WBC (cel/ul)	WBC (cel/ul)		WBC (cel/ul)		WBC (cel/ul)	
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							

2.- Resolución entre linfocitos y debris.

LISANTES	RBC Lysis Buffer					Excellyse I					Excellyse Easy							
	Linfocitos		Debris		Stain index	Resolución	Linfocitos		Debris		Stain index	Resolución	Linfocitos		Debris		Stain index	Resolución
	Media - FSC-A	Media-FSC-A	SD-FSC-A	Media - FSC-A			Media-FSC-A	SD-FSC-A	Media - FSC-A	Media-FSC-A			SD-FSC-A	Media - FSC-A	Media-FSC-A	SD-FSC-A		
Muestras																		
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7																		
8																		
9																		
10																		
11																		
12																		
13																		
14																		
15																		
16																		
17																		
18																		
19																		
20																		
21																		

3. Conservación de fluorescencias y aumento de CV.

Evaluación de la intensidad de fluorescencia.

	Excellyse I					Excellyse Easy					RBCL							
	Población positiva	Población negativa	IFMpos-IFMneg Diferencia	1x(SDneg)	2XSDneg 2	Resolución	Población positiva	Población negativa	IFMpos-IFMneg Diferencia	1x(SDneg)	2XSDneg 2	Resolución -DIF I2SD	Población positiva	Población negativa	IFMpos-IFMneg Diferencia	1x(SDneg)	2XSDneg 2	Resolución -DIF I2SD
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7																		
8																		
9																		
10																		
11																		
12																		
13																		
14																		
15																		
16																		
17																		
18																		
19																		
20																		
21																		

Fluorocromo	Población Positiva	Población Negativa
FITC	Neutrófilos	Linfocitos T
PE	Basófilos	Linfocitos T
PerCPcy5.5	Linfocitos T	Linfocitos NK
PE-Cy7	Linfocitos B	Linfocitos NK
APC	Monocitos	Linfocitos NK
APC- Cy7	Linfocitos T CD8	Linfocitos T CD4
PB	Linfocitos T CD4	Linfocitos T CD8
PO	Linfocitos totales	Basófilos

EVALUACION DEL COEFICIENTE DE VARIACION DE FLUORESCENCIAS

Muestras	CD4 PACIFIC BLUE (Linfo TCD4+)			CD45 PACIFIC ORANGE (linfocitos totales)			CD16 FITC (neutrófilos)			CD123 PE (Basófilos)			CD3 PercP-Cy5.5 (linfo T)			CD19 PE-Cy7 (Linfo B)			CD64 APC (Monocitos clásicos)			CD8 APC-Cy7 (Linfo TCD8+)		
	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL
1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
11																								
12																								
13																								
14																								
15																								
16																								
17																								
18																								
19																								

20																				
21																				

4.- DISTRIBUCIÓN CELULAR SSC/FSC

	NEUTROFILOS			LINFOCITOS			MONOCITOS			EOSINOFILOS			BASOFILOS		
	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL
1															
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															
11															
12															
13															
14															
15															
16															
17															
18															
19															
20															
21															

6. FRECUENCIAS DE LAS POBLACIONES.

	NEUTROFILOS			LINFOCITOS			MONOCITOS			EOSINOFILOS			BASOFILOS		
	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL	EASY	EX.I	RBCL
1															
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															
11															
12															
13															
14															
15															
16															
17															
18															
19															
20															
21															

Anexo n°7. Validación del instrumento.

CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DE LOS INSTRUMENTOS

TITULO DE LA INVESTIGACIÓN: Evaluación del desempeño de Lisante para el estudio de inmunofenotipo por Citometría de Flujo de Espectro completo en sangre periférica en un laboratorio privado, Lima-2023

Observaciones (precisar si hay suficiencia): Hay suficiencia

Opinión de aplicabilidad:

Aplicable [] Aplicable después de corregir [] No aplicable []

Apellidos y nombres del juez validador. Dr. Borja Velezmoro Gustavo Adolfo

DNI: 25709843

Correo: Institucional: gustavo.borja@uwiener.edu.pe

Especialidad del validador: Dr./Mg. Lic. Tecnología Médica

Metodólogo: []

Temático: []

Estadístico: []



Firma del experto informante

29 de marzo de 2023

CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DE LOS INSTRUMENTOS

TITULO DE LA INVESTIGACION: Evaluación del desempeño de Lisante para el estudio de inmunofenotipo por Citometría de Flujo de Espectro completo en sangre periférica en un laboratorio privado, Lima-2023

Observaciones (precisar si hay suficiencia): Hay suficiencia

Opinión de aplicabilidad:

Aplicable Aplicable después de corregir No aplicable

Apellidos y nombres del juez validador: Msc. Víctor Raúl Huamán Cárdenas

DNI: 70092305

Correo: Institucional: victor.huaman@uwiener.edu.pe

Especialidad del validador: Dr./Mg. Lic. Tecnología Médica

Metodólogo:

Temático:

Estadístico:



Firma del experto informante

8 de marzo de 2023

CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DE LOS INSTRUMENTOS

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: Evaluación del desempeño de Lisante para el estudio de inmunofenotipo por Citometría de Flujo de Espectro completo en sangre periférica en un laboratorio privado, Lima-2023

Observaciones (precisar si hay suficiencia): Hay suficiencia

Opinión de aplicabilidad:

Aplicable Aplicable después de corregir No aplicable

Apellidos y nombres del juez validador. Lic. TM. Montoya Mori Milagros

DNI: 09216886

Correo: Institucional: milagros.montoya@uwiener.edu.pe

Especialidad del validador: Lic. ~~TM Tecnología~~ Médica

Metodólogo:

Temático:

Estadístico:

14 de marzo de 2023



Firma del experto informante

Anexo n° 8: Matriz de categorización.

Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Diseño
<p>Problema General ¿Cuál será el lisante con mejor desempeño para el estudio de inmunofenotipo por Citometría de Flujo de espectro completo en sangre periférica en un laboratorio privado, Lima - 2023?</p> <p>Problemas específicos</p> <ol style="list-style-type: none"> ¿Cuál será la solución lisante que genere menor pérdida de la celularidad posterior al tratamiento de inmunifentipado de la muestra? ¿Cuál de los lisantes obtendrá mejor resolución respecto a los residuos 	<p>Objetivo General</p> <p>“Evaluar el desempeño de lisantes para el estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo de espectro completo en sangre periférica en un laboratorio privado, Lima, 2023”.</p> <p>Objetivos específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluar la pérdida de celularidad posterior a la 	<p>Evaluación de soluciones lisantes para estudio de inmunofenotipo, permitirá seleccionar con mejor desempeño de estas.</p>	<p>Desempeño de lisantes para estudio de inmunofenotipo.</p> <p>Dimensiones</p> <ul style="list-style-type: none"> -Pérdida de celularidad. -Resolución entre debris y linfocitos. - Efecto en los valores relativos de las 	<p>Tipo de investigación</p> <p>Deductivo</p> <p>Método y diseño de la investigación</p> <p>Método</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aplicada <p>Diseño</p> <p>Cuasi-experimental.</p> <p>Población, muestra y muestreo</p> <p>Población</p> <ul style="list-style-type: none"> -Donantes sanos de laboratorio cytometric Bioservices SAC.

<p>(debris/ruido electrónico), posterior a la lisis de muestra marcada y lavada?</p> <p>3. ¿Cuál de las soluciones lisantes afecta en menor proporción las distribuciones de poblaciones leucocitarias?</p> <p>4. ¿Cuál de las soluciones lisantes obtendrá una dispersión con mayor solapamiento de las poblaciones celulares en FSC y SSC con respecto a las del lisante patrón?</p> <p>5. ¿Cuál de los lisantes obtendrá mejor resolución entre poblaciones, según sus intensidades de fluorescencia media (IFM) y bajo coeficiente de variación?</p> <p>6.</p>	<p>lisis de la muestra marcada y lavada.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar la resolución de los linfocitos respecto a los residuos (debris/ruido electrónico), posterior a la lisis de muestra marcada y lavada. • Evaluar el efecto de los lisantes en las frecuencias de poblaciones leucocitarias entre los lisantes. • Evaluar el efecto de los lisantes en la distribución leucocitarias en FSC y SSC. 		<p>poblaciones leucocitarias.</p> <p>-Efecto en la dispersión de poblaciones leucocitarias en FSC y SSC</p> <p>- Efecto en la resolución de la fluorescencia según IFM.</p> <p>Indicadores:</p> <p>% de pérdida de leucocitos.</p> <p>Resolución (<i>Stain index</i>)</p> <p>-% de la pérdida de la población con respecto al lisante patron</p> <p>-CV de las poblaciones en FSC/SSC media \pm 1DS media \pm 2DS</p>	<p>Muestra: 21 muestras de sangre periférica con anticoagulante EDTA.</p> <p>Muestreo</p> <p>No probabilístico de tipo incidental.</p>
--	--	--	--	--

	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluar el efecto de los lisantes en la resolución entre poblaciones y coeficiente de variación según intensidades de fluorescencia mediana (IFM). 		<p>CV de las poblaciones en las fluorescencias utilizadas</p> <p>media \pm 1DS media \pm 2DS Resolución (Stain index)</p>	
--	--	--	--	--

ANEXO N° 09: CARTA DE APROBACIÓN DE COMITÉ DE ÉTICA



COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN

CONSTANCIA DE APROBACIÓN

Lima, 19 de junio de 2023

Investigador(a)
Elizabeth Huamanyalli Villar
Exp. N°: 0639-2023

De mi consideración:

Es grato expresarle mi cordial saludo y a la vez informarle que el Comité Institucional de Ética para la investigación de la Universidad Privada Norbert Wiener (CIEI-UPNW) evaluó y **APROBO** los siguientes documentos:

- Protocolo titulado: "Evaluación del desempeño de lisantes para el estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo de espectro completo en sangre periférica en un laboratorio privado, Lima-2023" Versión 01 con fecha 24/04/2023.
- Formulario de Consentimiento Informado Versión 01 con fecha 24/04/2023.

El cual tiene como investigador principal al Sr(a) Elizabeth Huamanyalli Villar y al investigador colaborador Cesar Alfonso Champa Guevara


La **APROBACIÓN** comprende el cumplimiento de las buenas prácticas éticas, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo de investigación y la confidencialidad de los datos, entre otros.

El investigador deberá considerar los siguientes puntos detallados a continuación:

1. La **vigencia** de la aprobación es de **dos años (24 meses)** a partir de la emisión de este documento.
2. El **Informe de Avances** se presentará cada 6 meses, y el informe final una vez concluido el estudio.
3. **Toda enmienda o adenda** se deberá presentar al CIEI-UPNW y no podrá implementarse sin la debida aprobación.
4. Si aplica, la **Renovación** de aprobación del proyecto de investigación deberá iniciarse treinta (30) días antes de la fecha de vencimiento, con su respectivo informe de avance.

Es cuanto informo a usted para su conocimiento y fines pertinentes.

Atentamente,


Yenny Marisol Bellido Fuente
Presidenta del CIEI-UPNW



Avenida República de Chile N°432. Jesús María
Universidad Privada Norbert Wiener
Teléfono: 706-5555 anexo 3290 Cel. 981-000-698
Correo: comite.etica@uwieneroia.pe

ANEXO N° 10: CARTA DE APROBACIÓN DE LA INTITUCIÓN PARA EL DESARROLLO DEL PROYECTO.



CONSTANCIA DE AUTORIZACIÓN INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo Dr. Richard Rodrigo Dyer Velarde-Álvarez - Patólogo identificado con DNI 08242204, en mi calidad de Director Médico de CYTOMETRIC BIOSERVICES SAC, localizado en Av. Del Aire 1308 en el distrito de San Luis, y Ing. Agustín Carlos Alberto Zafra Escobar con DNI 08699786 en calidad de Gerente General.

Autorizamos, a la Bachiller Huamanyalli Milir Elizabeth con DNI 46793790 de la universidad Norbert Wiener, la EJECUCIÓN de su PROYECTO de tesis para obtener el Título Profesional denominado "Evaluación del desempeño de lisantes para estudios de inmunotipo por Citometría de Flujo de espectro completo en sangre periférica en un laboratorio privado, Lima-2023". En la cual, se le brindará el acceso a nuestras instalaciones y equipos para que pueda realizar su trabajo.

Se expide la presente constancia para los fines que estime conveniente.

Lima, 14 de julio de 2023.

Atentamente,


Director Médico
Richard Rodrigo Dyer Velarde-Álvarez


Gerente General
Agustín Carlos Alberto Zafra Escobar

