HeMoStep™ kit

Determinación de la contaminación con sangre periférica del LCR

REF | Σ | IMS1510 | 100 test | CE IVD

1. USO PREVISTO

El kit HeMoStep es un inmunoensayo in vitro para la determinación cuantitativa de la contaminación sanguínea de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante citometría de flujo.

El uso previsto del ensayo es cuantificar la contaminación de las muestras de LCR con sangre periférica, ayudando, en combinación con otras pruebas como la citometría de flujo (CMF) y la citología (CC), a la correcta interpretación de los resultados procedentes del análisis de este tipo de muestras (LCR) y contribuyendo a mejorar el diagnóstico de la enfermedad leptomeníngea en pacientes con linfomas de células B y T y leucemias agudas de origen linfoide y mieloide.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

El análisis celular en LCR es un procedimiento clínico importante para el diagnóstico, la clasificación y el pronóstico de una amplia variedad de enfermedades. La recolección de la muestra de LCR se realiza mediante un procedimiento llamado punción lumbar (PL) que consiste en insertar una aguja en el canal espinal. Durante el procedimiento, la aguja atraviesa varias capas de tejido vascularizado hasta llegar al espacio subaracnoideo y puede introducirse sangre periférica (SP) en el tubo de muestra contaminando el LCR. Además, la punción a veces puede complicarse al provocar un aumento del sangrado, denominada PL traumática (hasta un 20%), lo que da como resultado una contaminación roja visible de la muestra de LCR. Este tipo de punción se denomina traumática[1]. Así, la presencia de células sanguíneas y la concentración afectada de algunas sustancias por contaminación sanguínea en el LCR pueden complicar el análisis y confundir el diagnóstico.

El inmunofenotipaje por CMF multiparamétrica combina una alta especificidad con una buena sensibilidad clínica y varios estudios y guías recomiendan este inmunofenotipado para un diagnóstico eficiente y fiable del LCR en pacientes con neoplasias hematológicas como linfomas de células B y T y leucemias agudas de origen linfoide y mieloide, en los que se sospecha infiltración tumoral en el LCR[2-4]. La evaluación de la contaminación del LCR con SP debe realizarse en todos los casos y especialmente en los casos que se observa la presencia de células sanguíneas y cuando hay presencia de células malignas en sangre periférica. En este sentido, a pesar de que el líquido cefalorraquídeo es cristalino, es habitual que presente una alteración del color debida o a un sangrado patológico en el sistema nervioso central (SNC) o como ya hemos comentado, a una punción traumática. En este segundo caso es difícil juzgar el grado de contaminación solo mediante inspección visual, ya que el umbral visual para la percepción de sangre en el líquido cefalorraquídeo varía de 400 a 6000 glóbulos rojos (RBC) por mm^3, según diferentes autores[1,5-6] e incluso una contaminación por sangre visiblemente indetectable puede alterar drásticamente el contenido de LCR.

Algunos de los métodos más habitualmente empleados para la estimación de la contaminación en el LCR por CMF están basados en el inmunofenotipado y la enumeración de células contaminantes absolutas en sangre periférica, principalmente RBC y/o neutrófilos. Sin embargo, este tipo de protocolos presentan limitaciones (baja precisión y escasa sensibilidad) relacionadas con la pérdida de células durante los pasos de concentración/centrifugación, pero también con la destrucción de células debido a los rápidos efectos citotóxicos in vitro del LCR sobre los leucocitos y, por lo tanto, sobre los neutrófilos (R Dux, 1994).

La evaluación de la calidad de la muestra de LCR es esencial en el diagnóstico y seguimiento de leucemias y linfomas y contar con un método que permite sortear las desventajas asociadas a la destrucción celular de este tipo de análisis puede ser un factor determinante para la obtención de resultados adecuados.

Este kit, basado en la cuantificación de hemoglobina total (Hb), marcador específico de RBCs, ayudando a interpretar los resultados de diagnóstico, ya que sortea los problemas derivados de la citotoxicidad del LCR, minimiza el uso de la muestra, lo que es particularmente importante en muestras paucicelulares[2,7] y mejora de forma muy significativa la sensibilidad para la determinación de la contaminación de LCR con SP.

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El kit HeMoStep es un inmunoensayo monoplex (población única) tipo Sandwich que permite la captura de un analito soluble (Hb). El ensayo está basado en microesferas recubiertas con un anticuerpo de captura y marcadas internamente con fluorescencia en FL3 (685 nm), presentando un patrón de intensidad de fluorescencia discreta con muy poca transferencia a FL1 (519 nm) o FL2 (578 nm), lo que deja otros detectores disponibles para la determinación del analito. En un primer paso, la muestra se incuba con las microesferas, permitiendo que el anticuerpo que tapiza las microesferas capture el analito presente en la muestra. A continuación, las microesferas se lavan para retirar el resto de la muestra y posteriormente se incuban con el anticuerpo detector, conjugado fluorescentemente con Ficoeritrina (PE). Después de un segundo lavado y resuspensión las microesferas se pueden analizar empleando un citómetro de flujo. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. El ensayo se puede llevar a cabo en cualquier citómetro de flujo convencional y es para uso profesional.

4. REACTIVOS

a) Contenido del kit

Los reactivos incluidos en un kit son suficientes para llevar a cabo 100 determinaciones. Cada kit HeMoStep contiene:

INCUB	**Buffer de incubación para el kit HeMoStep.** Un vial con 5.5ml (45µl/test).
BEADS	**Microesferas de captura tapizadas con un anticuerpo monoclonal específico de Hb.** Las microesferas de poliestireno magnéticas (diámetro medio de 6 µm), se suministran en 1 vial a la siguiente concentración: 2000 microesferas/test (5µl/test) y en una solución acuosa tamponada que contiene estabilizador de proteínas y azida sódica al 0,09% (NaN_3), como agente anti-microbiano.
WASHBUF 10X	**25 ml de tampón de lavado (10X).** PBS 10% BSA, pH 7,4 – 10X. Contiene 10% de albúmina en 10mM fosfato sódico, 150mM NaCl, pH 7.4, contiene KATHON™ agente anti-microbiano. Diluir el contenido del tampón de ensayo 10X a 1X (PBS 1% BSA) en PBS, pH 7,4, para usar en este ensayo.
CNTRL+	**Control positivo. 5 viales de lisado de RBCs liofilizado.** Solubilidad H_2O. Reconstituir antes de usar.
CAL	**Microesferas de calibración tapizadas con dos concentraciones diferentes de Hb (2 unidades)** Dos poblaciones distintas de microesferas magnéticas de poliestireno (diámetro medio de 6 µm) y un patrón interno de fluorescencia distinto de las microesferas de captura se suministran en formato seco en un único tubo de citometría de flujo con tapón. El número de microesferas suministradas es de 2000 (1000 microesferas de cada) por tubo.
STD	**Estándar de concentración conocida. 1 vial de lisado de RBCs liofilizado con concentraciones conocidas de [Hb].** Solubilidad H_2O. Reconstituir antes de usar. Se utilizará para generar la curva patrón.
CONJ	**1,2 ml de anticuerpo detector conjugado fluorescentemente (PE) (10 µl/test).** El anticuerpo se suministra en 2 viales (0,6 ml/vial), concentración de uso y en solución acuosa tamponada que contiene estabilizador de proteínas y azida sódica al 0,09% (NaN_3), como agente anti-microbiano.
i	**Instrucciones de uso.**

b) Materiales, reactivos y equipos requeridos no suministrados

- Citómetro de flujo equipado al menos con un láser azul, 488 nm, y canales fluorescentes para el PE (Ex-Max 496 nm/Em-Max 578 nm) y el PerCP (Ex-Max 482 nm/Em-Max 678 nm).
- Micropipetas calibradas ajustables que cubran un intervalo de 1-1000 µL y las correspondientes puntas de pipeta desechables.
- Puntas de pipeta.
- Pipetas Pasteur.
- Gradilla magnética; MagneSphere(R) Mag. Sep. Stand 12- hole, 12x75mm (PROMEGA, Ref Z5343).
- 12x75 mm Tubos de fondo redondo de poliestireno (Tubos de citómetro).
- 1,5 ml Eppendorf tube.
- Solución FACS Lysing (BD Biosciences, Catalog No. 349202), que se empleará durante el protocolo como diluyente de la muestra DILUB y control negativo CNTRL-.
- [PBS]; pH 7,4 (solución salina tamponada con fosfato) 1X, que se empleará para llevar a cabo la dilución del tampón de lavado 10X y en la preparación de la muestra.
- H2O desinonizada o destilada.
- Temporizador.
- Guantes desechables.
- Contendor de desechos de sustancias biológicas.

5. CONDICIONES DE AMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN ADECUADOS

Almacenar refrigerado entre +2 y +8°C. NO CONGELAR. El kit sin abrir es estable hasta la fecha de caducidad. No usar después de esta fecha. Después de abrir, los reactivos son estables si se almacenan entre +2 y +8°C y se protege de la contaminación. A excepción del estándar y los controles positivos que una vez reconstituidos deben de utilizarse inmediatamente. Si no es posible utilizarlos inmediatamente o hay un sobrante después de su utilización se recomienda desecharlos o en último caso congelar (-20 °C) donde pueden permanecer estables unos pocos días (por ejemplo 5 días). No dejar los reactivos abiertos y a una temperatura diferente a la de almacenamiento por más tiempo del estrictamente necesario.

6. RECOMENDACIONES Y ADVERTENCIAS

⚠ PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*. Sólo para uso profesional.

⚠ Sólo para personal de laboratorio cualificado.

⚠ Los componentes del kit contienen KATHON™ o azida sódica (NaN_3). Los compuestos deben ser disueltos con agua corriente antes de ser desechados. Se recomiendan estas condiciones para evitar depósitos en las tuberías. Ficha de datos de seguridad (MSDS) disponible en la web www.immunostep.com

⚠ Antes de comenzar el análisis, leer detenidamente las instrucciones. Desviaciones de los procedimientos recomendados podrían invalidar los resultados de los análisis. No sustituir o mezclar reactivos del kit de Immunostep con reactivos de otros fabricantes.

⚠ Antes de adquirir las muestras, es necesario asegurarse de que la configuración del citómetro de flujo y su compensación es la adecuada.

⚠ Mantener los componentes de kit fuera de la exposición directa de la luz durante el protocolo. Los anticuerpos y microesferas conjugadas fluorescentemente son sensibles a la luz.

⚠ Las muestras deben tratarse de la misma manera que aquellas que pudiesen transmitir infecciones. Debe disponerse de los métodos apropiados para su manejo.

⚠ Los reactivos no deben ser utilizados si el embalaje presenta evidencias claras de deterioro.

⚠ Usar equipos de protección personal para el manejo de muestras. Lavarse las manos adecuadamente después de manipular las muestras. Todos los procedimientos deben llevarse a cabo de acuerdo con normas de seguridad aprobadas.

⚠ Si los controles positivos y negativos no se montan en cada carrera de muestras, es importante recordar que deberían montarse de forma periódica para asegurar el correcto funcionamiento del kit una vez abierto.

⚠ Los reactivos en este kit incluyen sustancias de origen humano. Aunque los materiales de origen humano han sido probados y encontrados negativos para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), la hepatitis C y el virus de inmunodeficiencia humana, todos los materiales y muestras de pacientes deben ser manipulados y desechados como potencialmente infecciosos usando procedimientos de laboratorio seguros.

⚠ Analizar el color del líquido cefalorraquídeo. El LCR normal es transparente como el cristal, pero como resultado de un traumatismo, el LCR aparecerá de color rosa, con un contenido de más de 400 glóbulos rojos/µl. En este caso puede ser necesario realizar una dilución para el análisis, de acuerdo al punto 7.1 de esta hoja técnica.

7. TOMA DE MUESTRAS

Para los análisis de CMF multiparamétrica, recoger ≥2 ml de líquido LCR mediante PL. Refrigerar la muestra entre +2 y +8°C. La muestra debe de ser procesada hasta 1h después de la PL, en caso contrario es necesario estabilizarla[3] debido a los efectos citotóxicos del LCR sobre los leucocitos.

En el caso concreto de tener que enviar la muestra entre laboratorios o a un laboratorio central, es necesario estabilizar la muestra directamente en el momento de recogerla, existiendo varias soluciones comerciales disponibles en el mercado, que preservan las células unos días (por ejemplo, 48 h). Al llegar la muestra con estabilizante al laboratorio de análisis medir y anotar el volumen de LCR recibido. No olvidar restar la cantidad de solución estabilizante empleada.

7.1 Preparación de las muestras

Al llegar la muestra con estabilizante o no, al laboratorio de análisis, medir y anotar el volumen de LCR recibido. No olvidar restar la cantidad de solución estabilizante empleada. Posteriormente añadir 2 ml de un tampón salino filtrado/estéril ([PBS]; pH 7,4) a la muestra y centrifugar 5 min. 540 g y retirar el sobrenadante con mucho cuidado, evitando la pérdida de células, y resuspender el pellet celular en 300 µl de [PBS]; pH 7,4 filtrado/estéril. Para la tinción de la muestra y la combinación de anticuerpos a emplear se recomienda seguir las recomendaciones EuroFlow[8-9]. Después de la tinción, añadir 2 ml de solución FACS lysing (BD Biosciences) e incubar 5 min. a temperatura ambiente (RT). Después de la incubación centrifugar las muestras 5 min. 540 g y recoger en un tubo a parte el sobrenadante de lisis, mientras que las células que han quedado en el tubo que se ha centrifugado se resuspenden en 50 µl [PBS]; pH 7,4 filtrado/estéril, para continuar con el protocolo de adquisición al citómetro, de acuerdo a las recomendaciones EuroFlow[8-10].

El sobrenadante de lisis es el tipo de muestra analizable mediante este kit, ya que contiene el analito (Hb) que permite estimar el grado de contaminación de LCR con SP.

El sobrenadante de lisis se puede utilizar inmediatamente o se puede congelar (-20°C) hasta 6 meses, para su posterior utilización con el kit.

En el momento de montar el kit se recomienda hacer un análisis visual del color de la muestra, con el objetivo de determinar si será necesario llevar a cabo una dilución de dicha muestra, empleando la solución FACS lysing, para ello se adjunta una guía orientativa que permite, en función del color, estimar la dilución de la muestra, evitando el "efecto gancho" que se produce en muestras con alta concentración del analito y facilitar que la florescencia caiga dentro del rango de interpolación de la curva de calibración (Fig. 1).

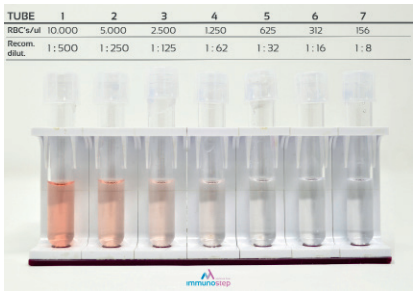


Figura. 1: Guía color orientativa que se corresponde con muestra de sobrenadante de lisis con diferentes concentraciones de RBCs y la dilución sugerida que se debería emplear.

Una vez decidida la dilución a utilizar, diluir las muestras en solución FACS lysing y mezclar con un agitador tipo vortex. Las muestras diluidas deben ensayarse dentro de las siguientes 2 horas.

8. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Atemperar los reactivos entre +18°C y +24°C (temperatura ambiente) durante 30 minutos.

El tampón de lavado incluido en el kit es un concentrado 10X. Si se observa cristalización en el tampón concentrado durante el almacenamiento, calentar a 37°C y agitar bien antes de hacer la dilución. Para llevar a cabo la dilución, se retira de la botella del concentrado la cantidad requerida para los ensayos y se diluye 1:10 en PBS, pH 7,4.

Reconstituir estándar y control positivo en 200 y 100 µl de H_2O respectivamente.

Rotular tantos tubos de fondo redondo de poliestireno de 12x75 mm (tubo de citómetro), como muestras, controles, microesferas de calibración y diluciones de la curva de calibración, se vayan a ensayar. Se recomienda hacer réplicas de cada muestra, estándar y controles.

9. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El protocolo puede ser llevado a cabo en un tubo de citómetro (12x75 mm) (ANEXO I).

1 Preparación de las microesferas de captura con la muestra	Resuspender el vial de microesferas de captura mediante un vórtex durante aproximadamente 20 segundos. Añadir a los tubos rotulados como muestra, controles y curva patrón, 5µl de las microesferas de captura. Añadir después 45µl del buffer de incubación del HeMoStep.
2 Preparación de los controles	El control positivo (+) se suministra liofilizado y debe de ser reconstituido inmediatamente antes de su utilización. Abrir el vial del control positivo (+) liofilizado y reconstituir con 100 µl de H_2O y mezclar con la pipeta, no agitar con vortex, después dejar que se equilibre durante 15 min a RT. Una vez equilibrado añadir 50 µl respectivamente del control positivo (+) y del control negativo (FACS lysing), a cada uno de los tubos identificados como tal anteriormente. Agitar con un vortex unos 20 segundos. Continúa en el paso n° 5.
3 Preparación de las microesferas de calibración	A continuación, se reconstituye el tubo de perlas de calibración añadiendo 50 µl de caseína durante aproximadamente 2 minutos. El procedimiento continúa en el paso 7 (incubación del conjugado).
4 Preparación de la curva patrón	El estándar se suministra en formato liofilizado y debe de ser reconstituido inmediatamente antes de su utilización. El kit contiene cantidad suficiente de estándar para hacer dos curvas patrón. Ir al punto 10 de este documento para más información. Continúa en el paso n° 5.
5 Incubación de la muestra	Incubar los tubos (muestra, controles, microesferas de calibración y tubos correspondientes a la curva patrón) durante **30 minutos** a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación.
6 Lavado	Después de la incubación lavar 1 vez la muestra (Hb unida a las microesferas) empleando 1 ml (tubo) del tampón de lavado 1X (ver punto 8 - Preparación de los reactivos) en cada lavado. Dejar el tampón de lavado en cada tubo entre 30 y 60 segundos por cada lavado. Posteriormente, recolectar las microesferas magnéticas colocando los tubos en una gradilla magnética e incubando 5 minutos. La recolección de las microesferas también se puede llevar a cabo mediante centrifugación a 2500xg durante 5 minutos. Retirar el sobrenadante de los tubos mediante decantación manual o por aspiración en el caso de haber utilizado la centrifugación. Tener cuidado de no alterar las microesferas y asegurándose de dejar un volumen mínimo de 50 µl y un máximo de 85 µl de sobrenadante en el tubo.
7 Incubación del conjugado	Añadir 10 µl del anticuerpo detector conjugado fluorescentemente en los tubos de citómetro. Agitar con vortex unos 20 segundos e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación.
8 Lavado	Después de la incubación lavar 1 vez tal y como se describe anteriormente (paso 6).
9 Medición	Resuspender la muestra en 200µl de PBS y adquirir en un citómetro de flujo. Se puede almacenar protegido de la luz como máximo 30 min a 2-8°C, hasta el momento de la adquisición en el citómetro. Ir al punto 11 de este documento para más información con la estrategia de análisis y adquisición.

10. PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN

A partir del estándar de concentración conocida incluido en el kit, preparar una dilución seriada (1:2) de 13 puntos (Fig. 2), empleando como solución el FACS lysing.

1 Reconstitución del liofilizado	Abrir el vial del estándar liofilizado y reconstituir con 200 µl de H_2O y mezclar con la pipeta, no agitar con vortex, después dejar que se equilibre durante 15 min a RT. Por último, transferir el estándar reconstituido a un tubo eppendorf de 1,5 ml. Este estándar es cantidad suficiente para generar dos curvas patrón en diferentes tiempos o dos réplicas en paralelo.
2 Realizar diluciones en serie	Rotular 13 tubos tipo eppendorf de 1,5 ml y ordenarlos de la siguiente manera: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 y 1:4096. Transferir el estándar reconstituido al tubo eppendorf de 1,5 ml, rotulado como 1:1 y pipetear 100 µl de solución FACS lysing a cada uno de los otros tubos rotulados (1:2 – 1:4096). A continuación, llevar a cabo diluciones seriadas, transfiriendo 100 µl desde el tubo estándar superior (1:1) al tubo de dilución 1:2 y mezclar bien empleando la pipeta. Continuar haciendo las diluciones seriadas transfiriendo 100 µl desde el tubo 1:2 al tubo 1.4 y así sucesivamente hasta el tubo 1:4096. Mezclar bien empleando la pipeta, no hacer vortex.
3 Transferir a los tubos de citómetro	Una vez realizadas las diluciones seriadas transferir 50 µl de cada una de las diluciones a los tubos 12x75 mm (tubo de citómetro), previamente rotulados (pto. 8 - preparación de los reactivos) y que ya contienen 50µl de las microesferas de captura. Recordar que es recomendable hacer dos réplicas de la curva patrón. Preparar un tubo 12x75 mm que contenga únicamente solución FACS lysing que se corresponderá con la concentración 0 ng/ml o unión no específica (NSB) y con el control negativo. Continuar en el paso n° 5 – "incubación de la muestra" del procedimiento de ensayo, punto 9 de este documento.

Las concentraciones (ng/ml) del analito (Hb) para cada dilución estándar, así como un esquema de la dilución seriada (1:2) del estándar incluido en el kit para la construcción de la curva estándar se muestran en el ANEXO II.

Gracias al uso de las microesferas de calibración no será necesario generar una curva patrón cada día de ensayo. Sólo será necesario generar una nueva curva patrón en los siguientes casos:

- Cuando se utiliza un kit de reactivos de un nuevo lote.
- Cuando ha cambiado la configuración del citómetro de flujo.

Ir al punto 12 de este documento para más información.

11. ADQUISICIÓN Y ESTRATEGIA DE ANÁLISIS AUTOMÁTICO DEL ENSAYO

Los archivos FCS generados por este ensayo pueden analizarse automáticamente con el software FLOWSTEP. El software permite la construcción de la curva de calibración y la interpolación de los archivos FCS correspondientes a las muestras, calculando así los niveles de contaminación y generando un informe de resultados detallado. Además, FLOWSTEP realiza los controles de calidad necesarios para garantizar la calibración y la precisión del ajuste de la curva.

La aplicación está diseñada para ser intuitiva y accesible para usuarios no expertos. Al emplearse junto con el kit HeMoStep, ofrece una solución integral para la cuantificación de la contaminación en el líquido cefalorraquídeo (LCR).El análisis de los resultados también se puede llevar a cabo de manera manual, tal y como se muestra en los siguientes apartados de esta ficha técnica.

12. ADQUISICIÓN Y ESTRATEGIA DE ANÁLISIS MANUAL DEL ENSAYO EN EL CITÓMETRO

Una adecuada estrategia de selección de la población de microesferas tiene que permitir la eliminación de dobletes y de restos de suciedad, contribuyendo a la correcta identificación de la población de microesferas.

12.1 Estrategia de análisis de muestras, controles y curva patrón

Se recomienda un primer paso de selección de la población de microesferas en el diagrama FSC-H/FSC-A para eliminar los dobletes (A), seguido por una selección de la población de microesferas en el diagrama de puntos SSC-A/FSC-A para retirar los restos de suciedad y reducir el marcaje de fondo (B), permitiendo la correcta identificación de la población de microesferas en un diagrama de puntos para cualquiera de los siguientes canales PerCP / APC, PerCP-Cy5 / APC o PerCP-Cy5.5 / APC (C).

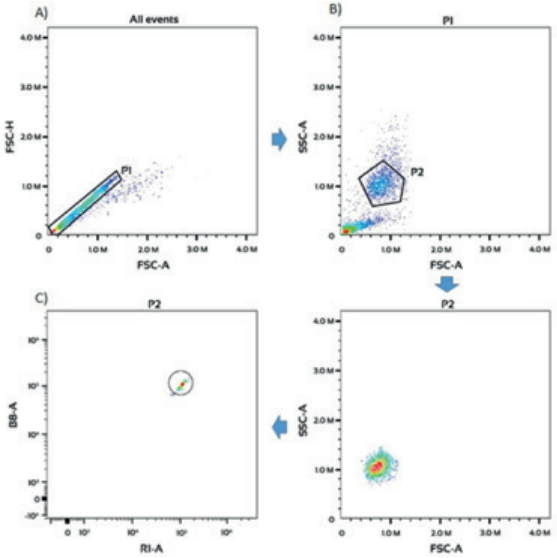


Figura. 2: Estrategia de análisis para la selección de la población de microesferas en los diagramas de puntos FSC-H/FSC-A (A); SSC/FSC (C) y PerCP/APC (C).

12.2 Estrategia de análisis microesferas de calibración

Como en el punto anterior, se recomienda un primer paso de selección de la población de microesferas en el diagrama FSC-H/FSC-A para eliminar los dobletes (A), seguido por una selección de la población de microesferas en el diagrama de puntos SSC-A/FSC-A para retirar los restos de suciedad y reducir el marcaje de fondo (B), permitiendo la correcta identificación de las dos poblaciones de microesferas de calibración en un diagrama de puntos para cualquiera de los siguientes canales PerCP / APC, PerCP-Cy5 / APC o PerCP-Cy5.5 / APC (C).

Las dos poblaciones de microsferas de calibración presentan IMF diferentes para el canal de fluorescencia PE, siendo las IMF de las dos poblaciones identificadas como "bottom" y "top" los parámetros (a) y (d) de la curva patrón respectivamente. Ir al punto 13.2 de este documento para más información.

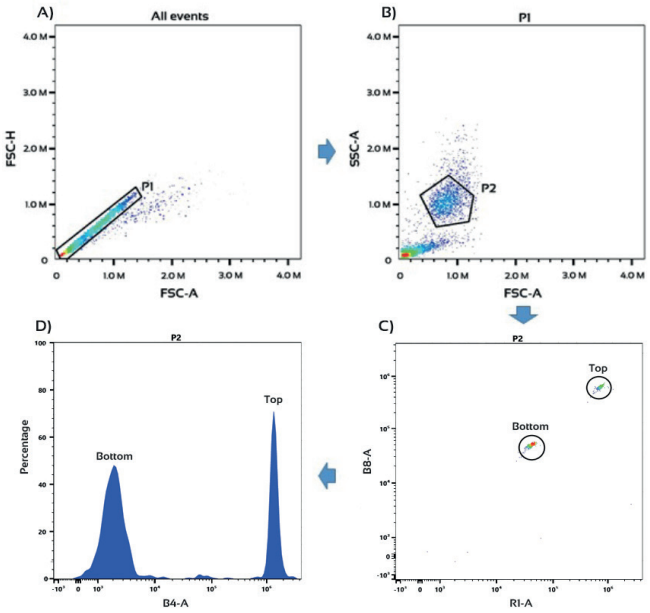


Figura. 3: Estrategia de análisis para la selección de las 2 poblaciones de microesferas de calibración en los diagramas de puntos FSC-H/FSC-A (A); SSC/FSC (C), PerCP/APC (C) e histograma PE (D).

13. ANÁLISIS DE RESULTADOS

13.1 Generación de la curva patrón

El ensayo cuantitativo emplea una función logística de cuatro parámetros (4PL) para convertir la señal de IMF en concentraciones.

El primer paso es generar la curva patrón mediante la utilización de un software capaz de generar una curva patrón cuyo ajuste se corresponda con este tipo de regresión (Fig. 4). Una alternativa es construir una curva estándar trazando la IMF para cada estándar en el eje (y) lineal contra la concentración en un eje (x) logarítmico (X=Log(X)) y dibujar la curva de mejor ajuste a través de los puntos en el gráfico. No incluir el NSB en la curva patrón.

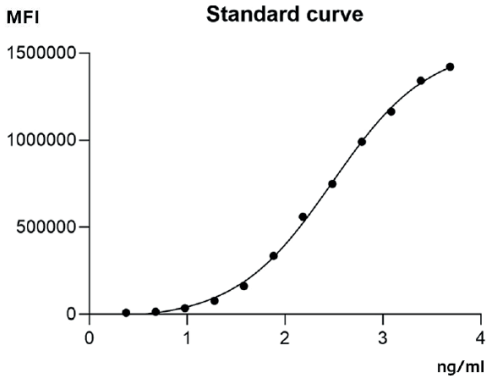


Figura. 4: Curva patrón modelo, sólo a modo de orientación. Se debe de construir una curva patrón por lote de kit empleado.

13.2 Calibración de la curva patrón

El modelo de ecuación de una función logística 4PL es el siguiente:

$$y = d + \frac{a-d}{1+\left(\frac{x}{c}\right)^{b}}$$

(x) = la variable independiente e (y) = la variable dependiente.

Los 4 parámetros estimados consisten en lo siguiente:
(a) = el valor mínimo que se puede obtener (es decir, lo que sucede en la concentración 0)
(d) = el valor máximo que se puede obtener (es decir, lo que sucede a una concentración infinita)
(c) = el punto de inflexión (es decir, el punto en la curva en forma de S a mitad de camino entre a y d)
(b) = Pendiente de Hill de la curva, que está relacionada con la pendiente de la curva en el punto (c).
(Estos parámetros vienen calculados por el software que estemos utilizando).

Y describen una curva patrón en forma de sigmoide como se muestra a continuación (Fig. 5):

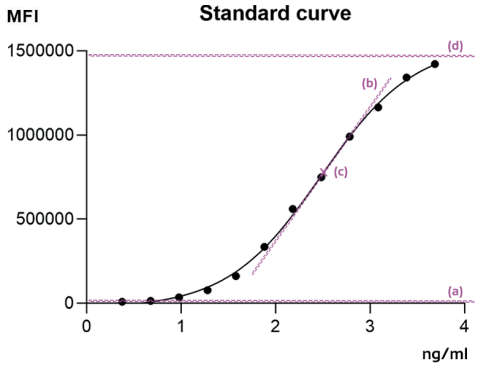


Figura. 5: Curva de forma sigmoidea correspondiente a la ecuación del modelo de regresión logística de cuatro parámetros (4PL).

Mientras que la ecuación reorganizada para resolver (x) es:

$$x = c\left(\frac{a-d}{y-d}-1\right)^{\frac{1}{b}}$$

Los parámetros (b) y (c) definen la forma de la curva y los parámetros (a) y (d) definen la posición de la curva y las unidades de la (y). Si el citómetro de flujo está correctamente mantenido y calibrado la forma de la curva patrón es estable y por lo tanto es posible calibrar esta función no lineal de 4PL con únicamente dos calibradores y la información correspondiente a los parámetros de la forma de la curva (b) y (c). Las microesferas de calibración, específicas de cada lote de kit, son dos poblaciones de microesferas que se corresponden con los parámetros (a) y (d) de la curva. Estas esferas deben de adquirirse en cada carrera de ensayos, lo cual, permite comprobar que sus valores de IMF están dentro de un intervalo de confianza (IC) del 95%, permitiendo la utilización de la curva patrón sin necesidad de calibrar, o bien si están fuera de ese IC 95%, permitirán ajustar la posición de la curva, no siendo necesario generar una curva patrón por cada ensayo. Ver punto 10 de este documento para más información.

La curva solo se puede usar para calcular concentraciones para señales de IMF dentro de (a) y (d). Las muestras fuera del rango determinado por (a) y (d) no se pueden calcular.

13.3 Análisis de la bondad del ajuste de la curva patrón

Para analizar cómo de bien se ajusta el conjunto de datos a la curva patrón generada, además de evaluar el valor R^2, se recomienda llevar a cabo el retrocálculo del estándar y de la recuperación del control positivo, ya que incluso si el valor de R^2 es muy alto (>0,99), la precisión del ajuste determinada por la recuperación de los estándares puede indicar lo contrario.

13.3.1 Retrocálculo del estándar

Se trata de calcular las concentraciones de cada una de las diluciones del estándar que dan lugar a la curva patrón después de que la regresión se ha completado y luego compararlas con el valor de concentración real usando la fórmula:

[obs] / ([exp]) x 100

[obs] = concentración observada
[exp] = concentración esperada

Este método arroja información sobre el error relativo en el cálculo de muestras, siendo lo más deseable que cada estándar caiga entre 70 y 130% del valor real, aunque se pueden emplear rangos más estrictos si se desea una mayor exactitud. De esta manera los resultados de muestras fuera de este rango podrían no ser precisos.

13.3.2 Recuperación del control positivo

Este método incorpora variables en la preparación del ensayo, así como el análisis de regresión, permitiendo evaluar la exactitud general del ensayo. Para ello se utilizará el control positivo con concentración conocida del analito y se analizará para determinar la proximidad entre el valor de concentración calculado y el valor real (CoA). El resultado se evalúa de la misma manera que la recuperación de los estándares, usando la fórmula: [obs]/([exp]) x100. Un valor de recuperación entre 80 y 120% es considerado aceptable.

13.4 Cálculo de la concentración del analito en las muestras

Calcular la concentración logarítmica de la Hb interpolando los valores de IMF de las muestras sobre la curva patrón. Seguidamente, calcular el antilogaritmo ($X = 10^X$) del valor resultante de la interpolación para obtener el valor de concentración de la [Hb] (Fig. 6). Si las muestras han sido diluidas, la concentración obtenida de la interpolación con la curva patrón y su transformación antilogaritmo debe de ser multiplicada por el factor de dilución.

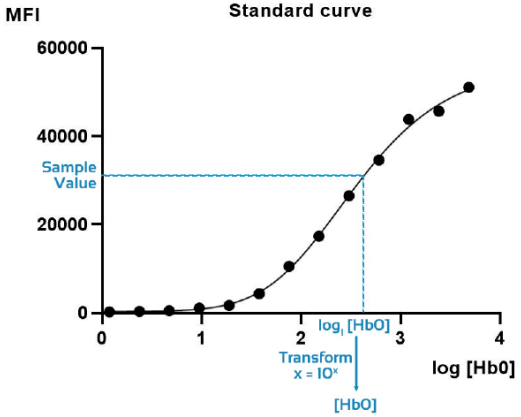


Figura. 6: Ejemplo de interpolación del resultado de IMF correspondiente a una muestra sobre la curva patrón y cálculo de la concentración de [Hb] en la muestra.

13.5 Interpretación de los resultados

Tradicionalmente la contaminación de LCR con SP debida a una PL traumática se ha expresado en [RBC/µl]. De esta manera, para una mejor interpretación y estandarización de los resultados se recomienda expresar el grado de contaminación en [RBC/µl].

Para ello, a partir del resultado de concentración de [Hb] del sobrenadante de lisis (punto 13.4) y empleando el volumen de LCR anotado (punto 7.1) y los valores de concentración de hemoglobina (g/dL) y el número de eritrocitos (n° RBC x10^6/µl) de la SP del paciente o del CoA, en caso de no contar con el hemograma, calcular la concentración de [RBC/µl] en el LCR, siguiendo el flujo de trabajo descrito en el ANEXO III.

De igual manera gracias al cálculo del factor de dilución de la SP en el LCR, descrito en el ANEXO III, también es posible estimar el número de leucocitos (WBC) presentes en la muestra de LCR procedentes de la contaminación con SP. Ir a ANEXO III para más información.

Conociendo el número de leucocitos (WBCs) atribuibles a contaminación sanguínea, es posible establecer la relación entre estos y el total de células patológicas detectadas en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Ir a ANEXO V para más información. Este dato suele estar disponible gracias a un análisis de inmunofenotipado realizado en paralelo sobre la muestra de LCR, con el objetivo de evaluar la posible infiltración celular, incluyendo el recuento absoluto de células patológicas.

A partir de la estimación de leucocitos contaminantes y del número de células patológicas identificadas mediante inmunofenotipado, se puede valorar si la contaminación es clínicamente significativa.

Además, si se determina que la contaminación es relevante y se dispone del porcentaje de células patológicas circulantes en sangre periférica, es posible evaluar si la infiltración observada en el LCR se debe a dicha contaminación (falso positivo), o si, por el contrario, se trata de una verdadera infiltración tumoral.

En este último caso, también se podría corregir el recuento descontando las células patológicas atribuibles a la contaminación, lo que permitiría una estimación más precisa de la carga tumoral en el LCR. Ir a ANEXO V para más información.

13.6 Valores esperados

El estudio se llevó a cabo con 105 muestras de LCR, que no presentaban contaminación mediante inspección visual.

La muestra analizada fue el sobrenadante de lisis resultante de procesamiento de la muestra y se obtuvieron los siguientes resultados:

	Todas las muestras			Muestras PL traumática		
	Mean	95th percentile	n	Mean	95th percentile	n
[Hb - ng/ml]	1201	34,47 - 2368	105	1845	288 - 3402	34
RBC/ µl*	38	9 - 67	82	101	21 - 182	29

**Calculado de acuerdo al punto 13.4 de este documento*

Cada laboratorio debe investigar los valores esperados a su propia población de muestras y, si es necesario, determinar sus propios rangos de referencia.

14. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

14.1 Capacidad de detección

El estudio del límite de detección, también denominado en ocasiones sensibilidad analítica, fue llevado a cabo de acuerdo a la guía EP17-A2 (CLSI). Evaluación de la Capacidad de Detección para Clínica. El resultado de este estudio se expresa en [Hb ng/ml].

- El límite de detección del test (LoD) o concentración mínima detectable del analito por el test es [3,15 ng/ml] de Hb.
- El límite de cuantificación del test (LoQ) o concentración de analito más baja que puede ser cuantificada con exactitud es [3,23 ng/ml] de Hb.

14.2 Precisión

Para el estudio de precisión intra-laboratorio se seleccionaron cuatro (4) muestras (negativa, LoD, control positivo y muestra positiva) y siguiendo recomendaciones de la CLSI (EP05-A3), Evaluación de la precisión de la medición cuantitativa.

De esta manera se seleccionó un diseño experimental 20 x 2 x 2, consistente en un estudio que al menos alcance los 20 días, con dos carreras por cada día que se lleva a cabo el ensayo y con dos replicas por muestra ensayada en cada carrera.

El ensayo se llevó a cabo en un sólo instrumento. Los resultados fueron los siguientes:

		Repetibilidad	Interserial	Interdía	Intralaboratorio
Pos	n	3,74			
	Valor medio (ng/ml)	92,03			
	SD (ng/ml)	3,74	13,75	3,74	13,75
	CV (%)	4,06%	14,95%	4,06%	14,95%
Control +	n	78			
	Valor medio (ng/ml)	10,85			
	SD (ng/ml)	0,35	1,80	0,35	1,80
	CV (%)	3,28%	16,85%	3,28%	16,85%
LoD	n	78			
	Valor medio (ng/ml)	2,90			
	SD (ng/ml)	0,03	0,11	0,03	0,11
	CV (%)	0,87%	3,86%	0,87%	3,86%
Neg	n	80			
	Valor medio (ng/ml)	2,41			
	SD (ng/ml)	0,02	0,03	0,02	0,03
	CV (%)	0,74%	1,14%	0,79%	1,11%

14.3 Reproducibilidad

De igual manera, se llevó un estudio de reproducibilidad, con un diseño experimental 5x2x2, consistente en un estudio de 5 días de duración, en dos laboratorios y dos réplicas de cada muestra. El estudio se llevó a cabo para ver si hay diferencias entre equipos, con los siguientes resultados:

		Entre lab
Positivo	n	20
	Media	131,9645973
	SD	37,6628082
	CV	23,19%
LoD	n	14
	Media	2,756914985
	SD	1,513798652
	CV	29,02%

14.4 Comparación de métodos

Se llevó a cabo una comparación de métodos entre el recuento absoluto de granulocitos neutrófilos por CMF (x) y el HemoStep kit (y), en un total de 29 muestras clasificadas como PL traumáticas de acuerdo a la coloración rojiza del LCR y/o a la observación de un pellet celular de color rojo después de centrifugar la muestra, demostrando una buena correlación lineal (r = 0,9081; p: <0,0001) directa entre las variables n° de granulocitos y n° de RBC calculados con cada uno de los métodos.

14.5 Especificidad analítica

Sangrados patológicos en el SNC dan como resultado la extravasación de RBC que se lisan en el LCR, con el catabolismo eventual de la hemoglobina a la bilirrubina[11]. Esto último ocurre aproximadamente 12 horas después de una hemorragia y persiste durante dos semanas. Por este motivo se analizó la posible reactividad cruzada que altos niveles de bilirrubina podrían tener sobre el rendimiento del ensayo. Para ello se seleccionaron muestras de LCR que fueron contaminadas artificialmente con SP y enriquecidas con 0,4 mg/ml de bilirrubina. Posteriormente las muestras se procesaron y analizaron siguiendo las instrucciones del kit y en ningún caso se observaron diferencias significativas entre las muestras enriquecidas con bilirrubina y las muestras no enriquecidas.

Por otro lado, también se analizaron las posibles interferencias de soluciones estabilizantes de LCR disponibles comercialmente como: TransFix (Cytomark) y Streck Cell Preservative (Streck Inc). Para ello se seleccionaron muestras de LCR y se contaminaron artificialmente con SP, para posteriormente diluirlas con TransFix al 1:10 y 1:20 y Streck Cell Preservative empleando una dilución 1:10, por último, se dejaron estabilizar durante la noche (O/N) a 4°C. Todos los casos se compararon con el LCR contaminado sin interferentes, ni estabilizantes. Así, las muestras se analizaron siguiendo las instrucciones del kit y en ningún caso se observaron diferencias significativas entre las muestras.

15. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los resultados deben valorase con combinación con otros procedimientos de diagnóstico.
- Los resultados fuera del rango determinado por la curva patrón. Ir al punto 12.2 de este documento para más información.
- Los resultados del ensayo dependen de que los procedimientos de toma y procesamiento de la muestra se hayan llevado a cabo correctamente.
- En la transformación del resultado de [Hb – ng/ml] del sobrenadante de lisis a [[RBC/µl] en el LCR, se asume que el volumen de FACS lysing empleado es de 2000 µl. Ir al ANEXO III para más información.

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Kaushal H Shah- et al (2003). Incidence of traumatic lumbar puncture. Acad Emerg Med. Feb;10(2):151-4.
2. Sancho, J.-M. et al. (2010) 'Clinical significance of occult cerebrospinal fluid involvement assessed by flow cytometry in non-Hodgkin's lymphoma patients at high risk of central nervous system disease in the Rituximab Era', European Journal of Haematology, 85(4), pp. 321–328.
3. Kraan, J. et al. (2008) 'Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid', Current Protocols in Cytometry, 45(1).
4. Subirá, D. et al. (2002) 'Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice', American Journal of Clinical Pathology, 117(6), pp. 952–958.
5. Patten, B.M. (1968) 'How much blood makes the cerebrospinal fluid bloody?', JAMA: The Journal of the American Medical Association, 206(2), p. 378.
6. Chow, G. and Schmidley, J.W. (1984) 'Lysis of erythrocytes and leukocytes in traumatic lumbar punctures', Archives of Neurology, 41(10), pp. 1084–1085.
7. Dux, R. et al. (1994) 'A standardized protocol for flow cytometric analysis of cells isolated from cerebrospinal fluid', Journal of the Neurological Sciences, 121(1), pp. 74–78.
8. Quijano, S. et al. (2009) 'Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell Non-Hodgkin's lymphoma: Improved sensitivity of flow cytometry', Journal of Clinical Oncology, 27(9), pp. 1462–1469.
9. van Dongen, J.J. et al. (2012) 'EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes', Leukemia, 26(9), pp. 1908–1975.
10. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Cerebrospinal fluid sample (CSF) preparation and small tube (SST) staining; EuroFlow, 2024.
11. CLSI. Body Fluid Analysis for Cellular Composition; Approved Guideline, H56-A. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.

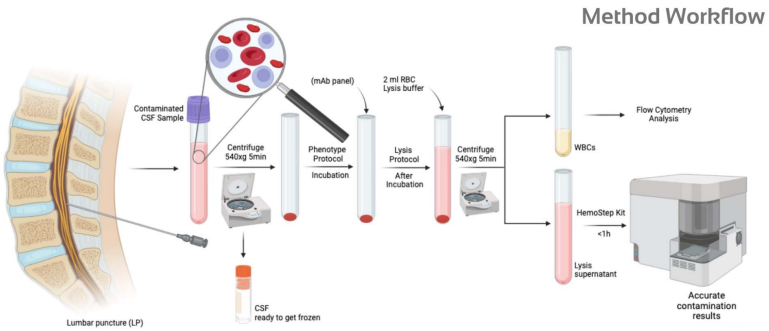
17. EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS

Σ	El contenido es suficiente para <n> análisis
REF	Referencia de producto
CE	Etiquetado CE
IVD	Medio de diagnóstico *in vitro*
	Fabricante
	Fecha de expiración
LOT	Número de lote
	Lea las instrucciones de uso
	Conservación de x°C a y°C
	Contenido de cada test
	Preste atención
	Peligros biológicos
BEADS	Microesferas de captura
WASHBUF 10X	Buffer de lavado 10x
CNTRL+	Control positivo
CAL	Microesferas de calibración
STD	Estándar de concentración conocida
CONJ IgG	Anticuerpo detector conjugado fluorescentemente

18. DATOS DEL FABRICANTE

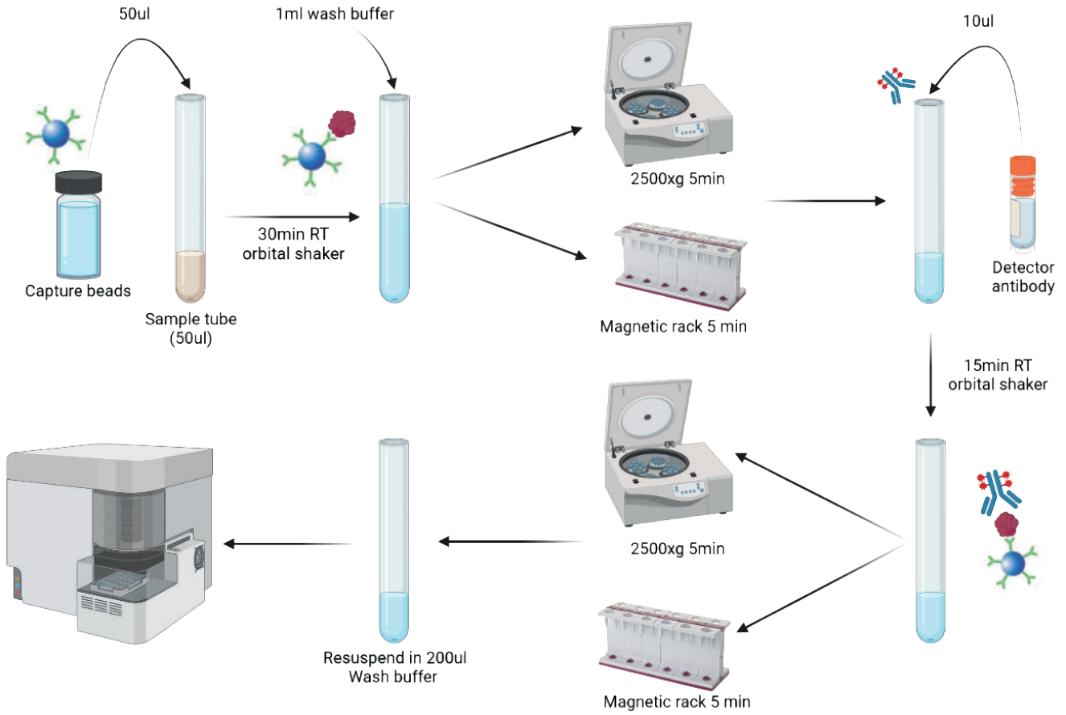
IMMUNOSTEP S.L.
Dirección: Avda. Universidad de Coimbra, s/n
Cancer Research Center (C.I.C)
Campus de Unamuno
37007 Salamanca (Spain)
Telf./fax: (+34) 923 294 827
E-mail: info@immunostep.com
www.immunostep.com

ANEXO I. LCR Preparación de muestras

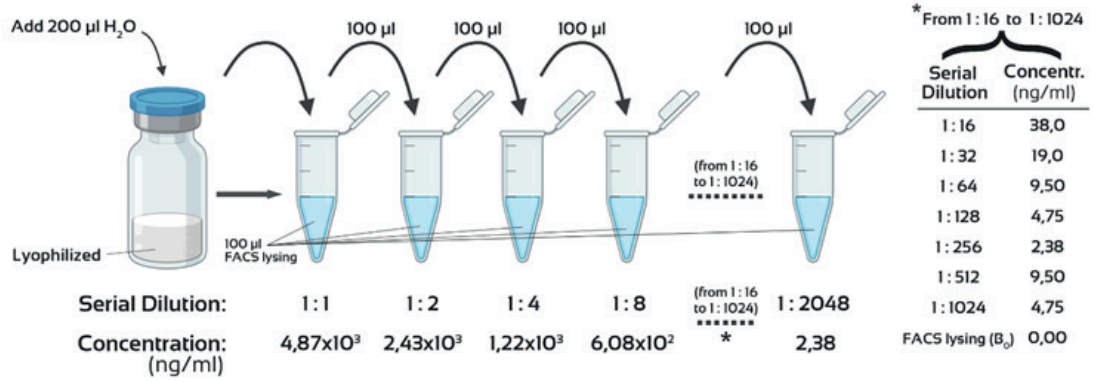


*Anotación: La preparación de la muestra de LCR se ajusta al procedimiento operativo estándar de Euroflow (POE).

ANEXO II. Flujo de trabajo en tubo de citómetro



ANEXO III. Dilución seriada (1:2) del estándar para la construcción de la curva patrón



*From 1:16 to 1:1024

Serial Dilution	Concentr. (ng/ml)
1:16	38,0
1:32	19,0
1:64	9,50
1:128	4,75
1:256	2,38
1:512	9,50
1:1024	4,75
FACS lysing (B_0)	0,00

ANEXO IV. Interpretación de los resultados

[Hb - ng/ml] sobrenadante de lisis

Calcula el ratio del volumen LCR/sobrenadante lisis (%)

Calcula [Hb - ng/ml] LCR, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$[\text{Hb - ng/ml}]\ \text{LCR} = \frac{[\text{Hb - ng/ml sobrenadante lisis} \times 6]}{a}$$

(a): Ratio del volumen LCR sobrenadante lisis (%)

I Transformar [Hb - ng/ml] resultado de la interpolación a g/dL, dividiendo por $1x10^7$
g/dL= (ng/ml) $1x10^7$

II Estimar el factor de dilución de la SP en el LCR, de la siguiente manera:
Factor dilución= a/b
(a)=[Hb - g/dL] del hemograma o CoA
(b)=[Hb - g/dL] resultado del paso n 1

III Calcular la concentración [RB C/µl] presente en la muestra de LCR, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$[\text{RB C/µl}] = \left(\frac{a}{b}\right)$$

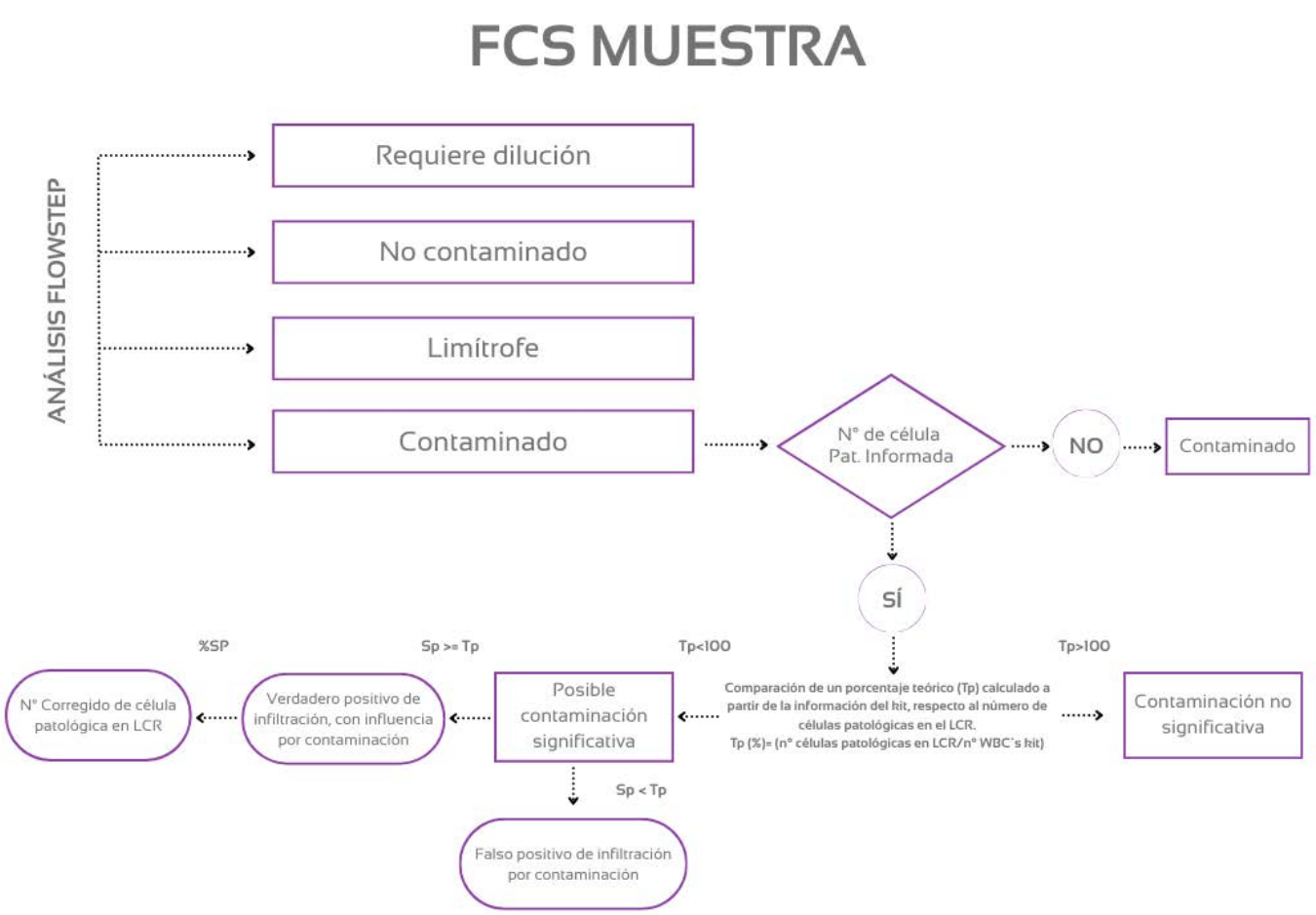
(a) = Nr. RBC x 10^6 /µl del hemograma o CoA
(b) = Factor dilución

IV Calcular el número de WBC presentes en la muestra de LCR, de acuerdo a la siguiente fórmula:

N° WBC= a/b X Vol. LCR

(a)= Nr. WBC X 10^3 /[Hb - g/µl del hemograma o CoA
(b)= Factor dilución

ANEXO V.


FCS MUESTRA
ANÁLISIS FLOWSTEP
Requiere dilución
No contaminado
Limítrofe
Contaminado
N° de célula Pat. Informada
NO
Contaminado
SÍ
Tp>100
Contaminación no significativa
Comparación de un porcentaje teórico (Tp) calculado a partir de la información del hit, respecto al número de células patológicas en el LCR.
Tp (%)= (n° células patológicas en LCR/n° WBC´s hit)
Tp<100
Posible contaminación significativa
Sp >= Tp
Verdadero positivo de infiltración, con influencia por contaminación
%SP
N° Corregido de célula patológica en LCR
Sp < Tp
Falso positivo de infiltración por contaminación