



BMJ/LBR/MGL/sam

**APRUEBA LAS RECOMENDACIONES PARA
INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES
LINFOCITARIAS EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA.**

RESOLUCIÓN EXENTA N°

0289 *12.02.2014

SANTIAGO,

VISTO Y CONSIDERANDO: Estos antecedentes, la providencia núm. 192, de 24 de enero de 2014, del Jefe (S) de Asesoría Jurídica; la providencia núm. 248, de 23 de enero de 2014, de la Dirección de este Instituto; el memorándum núm. 5, de 20 de enero de 2014, de la Jefa del Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia, en la que solicita aprobar los documentos que adjunta, para proceder a su publicación en la página Web Institucional; y

TENIENDO PRESENTE lo dispuesto en las facultades que me confiere la Ley Orgánica Constitucional de Bases Generales de la Administración del Estado; los artículos 60 y 61 letra a) del Decreto con Fuerza de Ley Núm. 1, de 2005, que fija el texto refundido, coordinado y sistematizado del Decreto Ley Núm. 2.763, de 1979 y de las Leyes Núm. 18.933 y Núm. 18.469; el artículo 10 letra a) del Decreto Supremo Núm. 1.222, de 1996, del Ministerio de Salud, que aprueba el Reglamento del Instituto de Salud Pública de Chile; así como lo establecido en la Resolución Núm. 1.600, de 2008, de la Contraloría General de la República; y en el Decreto Núm. 64, de 27 de septiembre de 2013, de la misma Secretaría de Estado, dicto la siguiente:

R E S O L U C I O N :

UNO. APRUÉBANSE las "RECOMENDACIONES PARA INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA", cuyo texto será del siguiente tenor:

"RESUMEN

Estas recomendaciones son elaboradas por el Laboratorio Nacional y de Referencia Inmunología del Instituto de Salud Pública y revisadas por un grupo de expertos que realizan inmunofenotipificación de subpoblaciones linfocitarias y con demostrada experiencia en el área de la citometría de flujo. El contenido de este documento fue acordado en el "III Taller de Subpoblaciones Linfocitarias en el Laboratorio de Inmunología" realizado el 11 y 12 de mayo 2012 y se basa en los procesos pre-analítico, analítico que incluye los métodos y equipamiento, aseguramiento de la calidad, proceso post-analítico que incluye validación de resultados e informe de resultado.

ALCANCE

Estas recomendaciones aplican a los laboratorios que realizan inmunofenotipificación de subpoblaciones linfocitarias a través de método de simple o doble plataforma por citometría de flujo.

INTRODUCCIÓN

El estudio por citometría de flujo de los subconjuntos de leucocitos es una herramienta valiosa para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades tales como inmunodeficiencia celular, leucemias y linfomas. La precisa cuantificación de los subgrupos de linfocitos es imprescindible para la clasificación diagnóstica y las decisiones terapéuticas que se basan en ellos, por lo tanto, existe una necesidad clínica para que el valor porcentual y recuento de subpoblaciones linfocitarias puedan ser lo más exactos y precisos posible.

En la década de 1980, estas estimaciones se realizaron utilizando gradiente de ficoll para separar linfocitos y analizar con microscopia de fluorescencia. Sin embargo, los recientes avances tecnológicos han hecho que tales métodos queden obsoletos y que el enfoque recomendado ahora sea la inmunofenotipificación linfocitaria multiparamétrica, utilizando sangre total y la incorporación de una de las tres estrategias de marcación-análisis (gating), a saber: gating T, gating de linaje y gating CD45/SSC.

La estandarización de esta metodología ha sido publicada a través de varios grupos de trabajo que han establecido guías técnicas dirigidas a mejorar los procesos asociados a esta determinación, estas actividades han permitido lograr resultados que están estrechamente distribuidos alrededor de la media, junto con un valor bajo de desviación estándar. La mayoría de los valores de coeficiente de variación (CV) son <5% para cada parámetro: CD3+, CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD19+ y CD16/CD56+.

En general, los recuentos absolutos se calculan a partir del número absoluto de linfocitos y el valor porcentual para el subconjunto de células, por un método denominado doble plataforma. En la actualidad, es reconocida la importancia de la variabilidad del recuento absoluto de células T como resultado del uso de diferentes contadores hematológicos. Para superar este problema, los laboratorios han incorporado el método de simple plataforma que es capaz de generar recuentos absolutos de células más precisos y exactos. Los programas de evaluación externa han demostrado que el CV es consistentemente más bajo usando dicha tecnología y han sugerido que este enfoque es el método de elección.

DEFINICIONES (TERMINOLOGÍA)

- **CD (cluster of differentiation o grupo de diferenciación):** son glicoproteínas que se expresan sobre la superficie de las membranas de las células sanguíneas y endoteliales. La nomenclatura CD, define al antígeno con la sigla CD a la cual se asigna un número por ejemplo: CD4. La mayoría son receptores de membrana. Su cantidad varía según el grado de maduración de la célula o cuando se activan algunas de sus funciones. Su presencia les confiere carácter de "marcadores" y permiten la clasificación celular.
- **Doble plataforma:** método que permite determinar la concentración celular absoluta usando datos derivados de la medición con dos instrumentos: citómetro de flujo y contador hematológico.
- **Forward Scatter (FSC):** medición de la luz en un ángulo radial < 90° en relación a la fuente de luz incidente. Es comúnmente usado para una estimación del "tamaño relativo" de una célula o partícula.
- **Estrategia marcación-análisis (gating):** set de parámetros usados para seleccionar electrónicamente un grupo en particular de células para su evaluación. Ejemplo, **gating T:** estrategia de marcación-análisis a partir de la región de linfocitos T.
- **Pipeteo reverso:** técnica recomendada para pipetear soluciones con una gran viscosidad (como es la sangre) o tendencia a formar espuma. Sólo se puede realizar con pipetas de desplazamiento de aire.

- **Side Scatter (SSC):** medición de la luz en un ángulo recto (90°) en relación a la fuente de luz incidente. Es comúnmente usado para una medida relacionada con la "complejidad interna y superficial" de una célula o partícula, tal como granularidad citoplasmática, irregularidad de membrana y/o forma nuclear.
- **Simple plataforma:** es un método que permite determinar la concentración celular absoluta usando todos los datos derivados de la medición con un citómetro de flujo.

DESARROLLO

1. PROCESO PRE-ANALÍTICO

1.1 RECOMENDACIONES GENERALES

- 1.1.1 El laboratorio debe recibir junto con la muestra el formulario de solicitud de examen, el cual debe indicar claramente fecha, hora y responsable de la toma de muestra, entre otros antecedentes.
- 1.1.2 La muestra para realizar este procedimiento es sangre total y para conservar su integridad, se recomienda colectar la muestra en tubo con anticoagulante EDTA-K2, o EDTA-K3.
- 1.1.3 Las muestras pediátricas deben ser obtenidas en tubos pediátricos.
- 1.1.4 El volumen de muestra debe ser de acuerdo con las especificaciones del fabricante del tubo.
- 1.1.5 El tubo debe estar al menos rotulado con el nombre del paciente o código (identificador único).

1.2 RECOMENDACIONES PARA RECUENTO CON CONTADOR HEMATOLÓGICO

- 1.2.1 El resultado óptimo se obtiene dentro de las primeras 6 horas después de tomada la muestra, aunque puede variar dentro del tiempo permitido por el fabricante del contador hematológico, pero no puede exceder las 24 horas. Se recomienda que cada laboratorio verifique su contador hematológico para establecer el tiempo más apropiado.
- 1.2.2 El recuento debe ser realizado sólo en equipo automatizado y dentro del tiempo especificado en 1.2.1. Si la muestra es derivada y no es posible que llegue al laboratorio dentro de 6 horas, se recomienda enviar junto a la muestra, el hemograma correspondiente.
- 1.2.3 La muestra debe ser conservada y transportada entre (15°-25°C).
- 1.2.4 La muestra debe ser rechazada en caso de hemólisis, grumos, microcoágulos o congelamiento visible, incorrecto llenado del tubo, mal rotulado.

1.3 RECOMENDACIONES PARA INMUNOFENOTIPIFICACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

- 1.3.1 Para conservar la integridad de la muestra, se recomienda colectar la muestra en tubo con anticoagulante EDTA-K3, EDTA-K2, (tubos tapa lila) o Heparina (tubo tapa verde). El laboratorio debe usar el anticoagulante validado por el fabricante de los reactivos, en caso contrario debe validar su metodología.
- 1.3.2 La muestra se conserva y transporta a T° ambiente (15°-25°C).
- 1.3.3 La muestra debe ser rechazada en caso de hemólisis, grumos, microcoágulos o congelamiento visibles, incorrecto llenado del tubo o visiblemente manchado con sangre, mal rotulado.
- 1.3.4 El resultado óptimo se obtiene dentro de las 30 horas de tomada la muestra.
- 1.3.5 A partir de la extracción de la muestra, el tiempo máximo de conservación para realizar la marcación con anticuerpos monoclonales es hasta 48 horas, tiempo que puede variar entre los fabricantes de reactivos. Una vez realizada la marcación se debe analizar por citometría de flujo dentro de las siguientes 24 horas. La muestra recibida después de 48 horas debe ser rechazada.

Ryc

PROCESO ANALÍTICO.

2.1 EQUIPAMIENTO

- 2.1.1 Los instrumentos citómetro de flujo, contador hematológico y gabinete de bioseguridad de clase II deben disponer del programa de mantención preventiva de acuerdo a lo indicado en el manual del fabricante del equipo. Además, se debe disponer de ficha de equipo, instructivos y registros de uso.
- 2.1.2 El gabinete debe disponer del certificado de "control de aire". La certificación debe ser realizada por un organismo autorizado.
- 2.1.3 El citómetro de flujo debe cumplir con los requisitos de instalación establecidos por el fabricante del equipo.
- 2.1.4 Debe existir un control diario de temperatura donde se encuentra instalado el citómetro de flujo y en donde se almacenan los reactivos y controles. El control de temperatura se realiza con termómetros que presentan su certificado de calibración vigente; se debe llevar el registro correspondiente.
- 2.1.5 Las micropipetas deben estar calibradas y verificadas en balanzas que se encuentran debidamente calibradas. El tiempo entre verificaciones no debería superar los 6 meses, el procedimiento de verificación debe estar documentado

2.2 MÉTODO

- 2.2.1 En la preparación de la muestra se debe respetar las indicaciones del fabricante de los reactivos respecto de volumen y concentración de muestra, junto con los volúmenes de reactivos. En caso de realizar algún cambio en el método éste debe ser validado; sino existen cambios debe verificar la metodología. Ambos casos deben ser documentados.
- 2.2.2 El laboratorio puede obtener el número absoluto por alguno de los siguientes dos métodos:
 - Simple plataforma, es decir, en un citómetro de flujo, siguiendo las recomendaciones del fabricante.
 - Doble plataforma, que incluye dos instrumentos: citómetro de flujo y contador hematológico.
- 2.2.3 Se recomienda usar el método de simple plataforma ya que se ha demostrado que presenta una mejor precisión con resultados de menor variabilidad interlaboratorio comparado con el método de doble plataforma. Sin embargo, si se dispone sólo del método de doble plataforma se considera primordial aplicar las recomendaciones de los puntos 2.1.1 y 2.3.1.
- 2.2.4 El pipeteo manual o electrónico de sangre y perlas fluorescentes debe ser exacto y preciso durante la aplicación del método de simple plataforma. El pipeteo reverso es la técnica recomendada por los fabricantes de reactivos para dispensar estos productos.
- 2.2.5 Un método de lavado/no-lavado es requerido para simple plataforma, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.
- 2.2.6 El laboratorio que realiza inmunofenotipificación de linfocitos debería disponer de paneles de anticuerpos monoclonales y un sistema de medición (simple o doble Plataforma) que permita cuantificar CD3, CD4, CD8, CD19 y CD16/56 en porcentaje y número absoluto.
- 2.2.7 Los paneles de anticuerpos monoclonales sólo utilizan la estrategia de marcación-análisis CD45/SSC para determinar la población de linfocitos basados en propiedades de alto brillo fluorescente de CD45 y baja dispersión de luz en SSC. La dispersión de luz esperada para la región de linfocitos puede ser obtenida de FSC/SSC.

2.3 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 2.3.1. Si el laboratorio informa con doble plataforma debe documentar el control de calidad interno del contador hematológico y mantener registros completos que además incluye lo indicado en el punto 2.1.1.

- 2.3.2. Para obtener resultados óptimos en el citómetro de flujo se deben realizar las actividades de control recomendadas por el fabricante del instrumento, tales como:
- Verificar alineación óptica diaria. Esto asegura señales más brillantes y ajustadas en todos los parámetros.
 - Estandarización diaria. Esto asegura que el citómetro de flujo está funcionando de manera óptima cada día y que su funcionamiento es el mismo día a día.
 - Compensar la superposición espectral según necesidad. Este paso corrige la superposición espectral de un fluorocromo en el espectro de fluorescencia de otro fluorocromo.
- 2.3.3. El laboratorio debe utilizar material de control de al menos dos niveles de concentración de procedencia comercial, cuya matriz sea humana.
- 2.3.4. Los resultados obtenidos del control de calidad Interno deben ser presentados a través de un método gráfico como por ejemplo "carta control de Levey-Jennings", donde los resultados se grafican secuencialmente en el tiempo (eje X), de acuerdo a su concentración (eje Y). En ella se deben establecer los límites de decisión para descartar errores analíticos a través de la aplicación de la(s) regla(s) de Westgard. El análisis de los resultados permite la validación de una corrida analítica y el seguimiento de la fiabilidad metrológica a través de la imprecisión analítica.
- 2.3.5. El laboratorio debe participar de un programa de evaluación externa de la calidad que debería proporcionar, en lo posible, muestras semejantes a las de pacientes. Este alcance incluye también el contador hematológico, en caso de realizar la estrategia de doble plataforma de medición. La dirección del laboratorio debe hacer seguimiento de los resultados y participar en la implementación de acciones correctivas, cuando no se cumpla el criterio de control.
- 2.3.6. Si los controles están fuera de rango se recomienda aplicar las medidas correctivas indicadas en el documento ISP-CC-03/2009 "GUÍA TÉCNICA NORMALIZADA DE CONTROL DE CALIDAD".

PROCESO POST-ANALÍTICO.

3.1 Para evaluar los resultados se debe considerar:

- La suma del porcentaje de células CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ debe ser igual al porcentaje total de células CD3+ dentro de $\pm 5\%$, permitiendo un máximo de variabilidad $\pm 10\%$. Sin embargo para muestras que contienen un número considerable de inusuales subgrupo de células T, es decir; células T $\gamma\delta+$, CD3+CD4+CD8+ o CD3+CD4-CD8-, esta verificación de confiabilidad puede sobrepasar los límites.
- Se sugiere colocar una nota al médico tratante cuando los valores de células T $\gamma\delta+$, CD3+CD4+CD8+ superen el 5% y cuando las células CD3+CD4-CD8- superen el 10%.
- La suma del porcentaje de células T (CD3+), B (CD19+) y células NK (CD3-/CD16 y/o CD56+) debe ser igual a la pureza de los linfocitos dentro de $\pm 5\%$, con una variabilidad máxima $\leq 10\%$. Si los datos son utilizados para evaluar la pureza de linfocitos, la suma idealmente debería estar entre 95% y 105%.
- El análisis de los resultados debería en lo posible considerar el comportamiento histórico del paciente.

3.2 Informe de resultados:

Se debe cumplir lo descrito en el artículo 16 del Decreto 20 "Reglamento de Laboratorios Clínicos". Además se requiere contemplar los siguientes aspectos:

- Debe estar escrito en idioma español.
- Debe incluir intervalos de referencia biológica y su procedencia.
- Mantener un registro de entrega de informes.
- El laboratorio debe conservar copias o archivos de los resultados informados.
- Cuando los resultados necesiten ser transcritos por el laboratorio que lo derivó, debe existir procedimientos para verificar que la transcripción sea correcta.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de expertos en inmunofenotipificación de subpoblaciones linfocitarias, que contribuyeron en la revisión del documento, a los profesionales que participaron en el III Taller: "Subpoblaciones Linfocitarias en el Laboratorio de Inmunología" 10 y 11 de mayo 2012 en el Instituto de Salud Pública de Chile y a los expositores: Dr. César Collino (Hospital Rawson - Córdoba, Argentina), Dra. Raquel Aguilera (Hospital Clínico Universidad de Chile), TM. Soledad Ripamonti (Hospital Clínico Universidad de Chile), TM. Hildegard Kranen (Hospital Dr. Lucio Córdova).

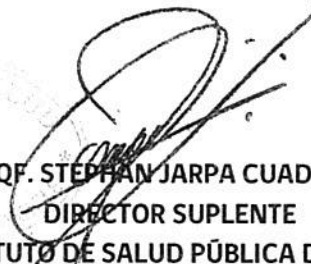
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Epidemiology Program Office. 1997 revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep 1997; 46: 1-29.
2. Mandy FF, Nicholson JK and McDougal JS. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep 2003; 52: 1-13.
3. Calvelli, T., T. N. Denny, H. Paxton, R. Gelman, and J. Kagan. Guideline for flow cytometric immunophenotyping: a report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. Cytometry 1993; 14:702-715.
4. Gelman R, Wilkening C. Analyses of quality assessment studies using CD45 for gating lymphocytes for CD3+4+%. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 2000; 42:1-4.
5. Hultin LE, Chow M, Jamieson BD, O'Gorman MR, Menendez FA, Borowski L, Denny TN and Margolick JB. Comparison of interlaboratory variation in absolute T-cell counts by single platform and optimized dual-platform methods. Cytometry B Clin. Cytom. 2010; 78: 194-200.
6. Reimann KA, O'Gorman MR, Spritzler J, Wilkening CL, Sabath DE, Helm K and Campbell DE. Multisite comparison of CD4 and CD8 T lymphocyte counting by single- versus multipleplatform methodologies: evaluation of Beckman Coulter flow-count fluorospheres and the tetraONE system. The NIAID DAIDS New Technologies Evaluation Group. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000; 7: 344-351.
7. Schnizlein-Bick CT, Spritzler J, Wilkening CL, Nicholson JK and O'Gorman MR. Evaluation of TruCount absolute-count tubes for determining CD4 and CD8 cell numbers in human immunodeficiency virus-positive adults. Site Investigators and the NIAID DAIDS New Technologies Evaluation Group. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000; 7: 336-343.
8. Schnizlein-Bick CT, Mandy FF, O'Gorman MRG, et al. Use of CD45 gating in three- and four-color flow cytometric immunophenotyping: guideline from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. Cytometry (Clinical Cytometry) 2002; 50:46-52.
9. H42A-A2. Enumeration of Immunologically Defined cell populations by Flow Cytometry Approved Guideline-Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
10. H18-A4 . Procedures for the Handling and Processing of Bloods Specimens for Common Laboratory Test; Approved Guideline-Fourth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
11. Olteanu H., Schur BC., Harrington A. and Kroft S. Time and temperature stability of T-cell subsets evaluated by a dual-platform method. Am J. Blood Res 2012; 2 (2): 128-135.
12. Olson WC., Smolkin ME., Farris EM., Fink RJ., Czakowski AR., Fink JH., Chianese-Bullock KA. And Slingluff CL. Shipping blood to a central laboratory in multicenter clinical trials: effects of temperature on mononuclear cell yield, viability and immunologic function. Journal of Translational Medicine 2011; 9:26.

13. Jalla S., Sazawal S., Deb S., Black R., Narayan Das S, Sarkar A., and Bhan M. *Enumeration of lymphocyte subsets using flow cytometry: Effect of storage before and after staining in a developing country setting*. Indian J. Clin. Biochem. 2004 July; 19(2): 95-99.
14. Lambert C. and Genin C. *CD3 bright lymphocyte population reveal $\gamma\delta$ T cells*. Cytometry B Clin. Cytom. 2004; 61B: 45-53.
15. Andreu-Ballester JC., García-Ballesteros C., Benet-Campos C. Amigó V, Almela-Quilis A., Mayans J. and Ballester F. *Values for $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-Lymphocytes and CD4+, CD8+, and CD56+ subsets in Healthy Adult Subjects: Assessment by Age and Gender*. Cytometry B Clin Cytom 2012; 82B: 238-244.
16. Ministerio de Salud. *Decreto N° 20 Aprueba reglamento de Laboratorios Clínicos*. 2012. Publicado en el Diario Oficial de 28 de abril de 2012.
17. ISO. NCH-ISO 15189 Laboratorios clínicos - requisitos particulares para la calidad y la competencia; 2012.".

DOS. AUTORIZASE al Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia de este Instituto, a efectuar la elaboración de las "Recomendaciones para Inmunofenotipificación de subpoblaciones linfocitarias en el Laboratorio de Inmunología", en los formatos que estime pertinentes, siempre y cuando, su contenido se encuentre al tenor del texto aprobado en el presente acto administrativo.

Anótese, comuníquese y publíquese en la página Web institucional.


QF. STEPHAN JARPA CUADRA
DIRECTOR SUPLENTE
INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE

Resol. A1/N°100
 6/02/2014

Distribución:

- Dpto. Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia
- Subdpto. Coordinación Externa
- Unidad de Comunicaciones e Imagen Institucional ✓
- Asesoría Jurídica
- Oficina de Partes




 Transcrito fielmente
 Ministro de fe



847

Inventory of Land and Water	
of the	
State of	California
June 1, 1914	

6/2 14