

# SEI



**43** CONGRESO DE LA  
**SOCIEDAD ESPAÑOLA  
INMUNOLOGÍA**

**LEÓN 22-24  
SEPTIEMBRE 2022**

PALACIO DE CONGRESOS Y EXPOSICIONES DE LEÓN.



 **SEI**  
Sociedad Española  
de Inmunología

Encuesta GETHIT

# Aspectos metodológicos prueba cruzada por citometría flujo: hacia la validación y estandarización según la regulación actual

Juan Torres Canizales

Resultados preliminares

22/09/2022

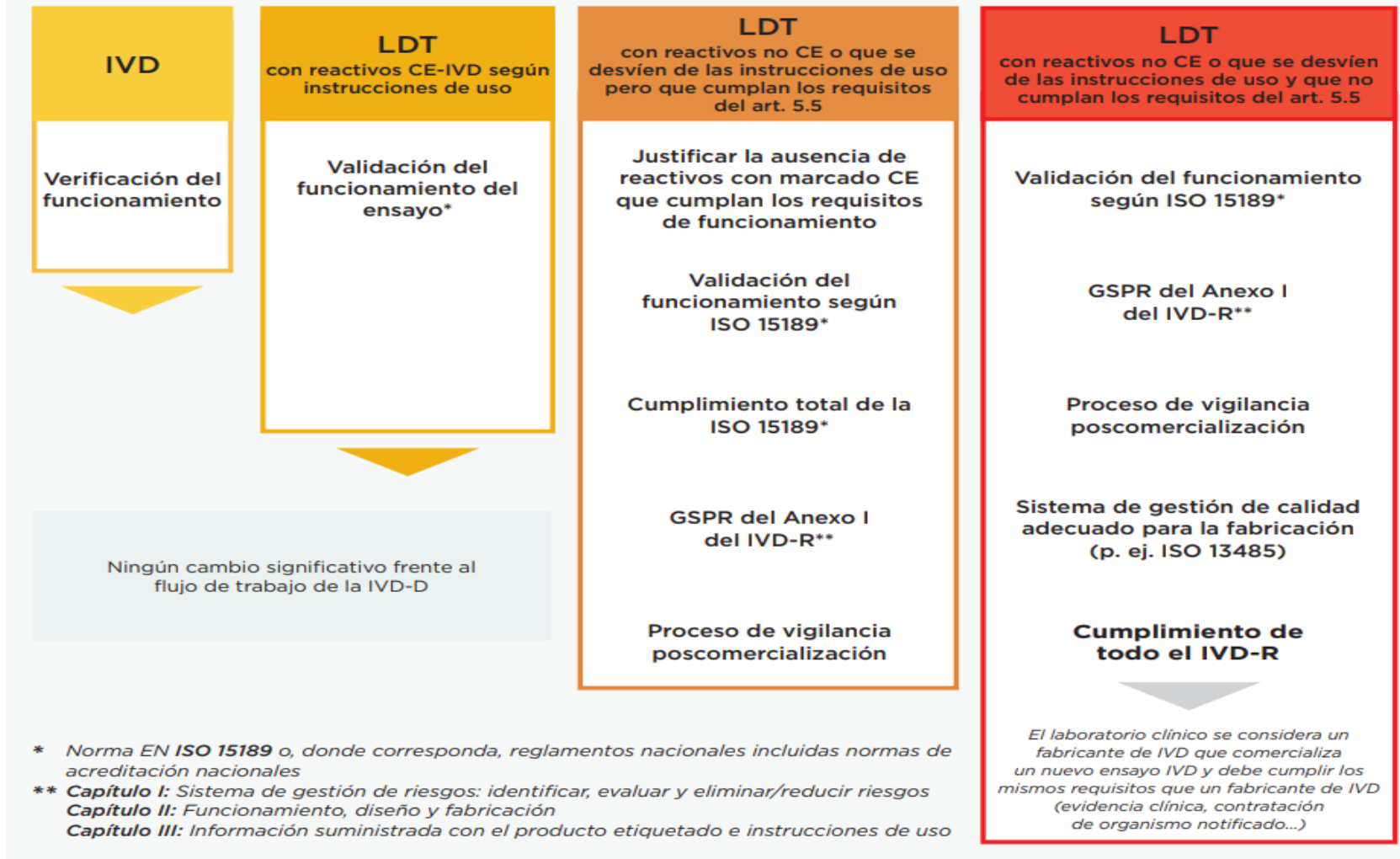


# Introducción

- Los LDT son métodos de prueba de diagnóstico *in vitro* que se realizan mediante el uso de dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* (IVD) que se desarrollan, fabrican y utilizan dentro de una institución sanitaria.
- El nuevo Reglamento (UE) 2017/746 ("EU IVDR") que se publicó en mayo de 2017 y se aplica plenamente a partir del 26 de mayo de 2022, establece por primera vez requisitos armonizados para IVD.
  - Requerimientos IVD para LDT pasan a ser responsabilidad de la institución que los realiza.



# Pruebas desarrolladas en laboratorio (LDT) frente al flujo de trabajo de validación IVD



# Principales pasos para verificar o validar un método IVD-R

## Bibliography

**1**

- Validation report can refer to other documents (e.g., from manufacturer, literature, internal documents from the lab) as long as they are correctly referenced and accessible.

## Define criteria & requirements\*

**2**

- Can be based on: interval of reference values, opinion from clinician, scientific societies or working groups, state of art, internal and external quality control results, data from manufacturer, etc.
- Aligned with applicable local regulatory requirements and international consensus

## Experimental data

**3**

- Generate experimental data according to the methodology defined by the laboratory

## Monitor performance

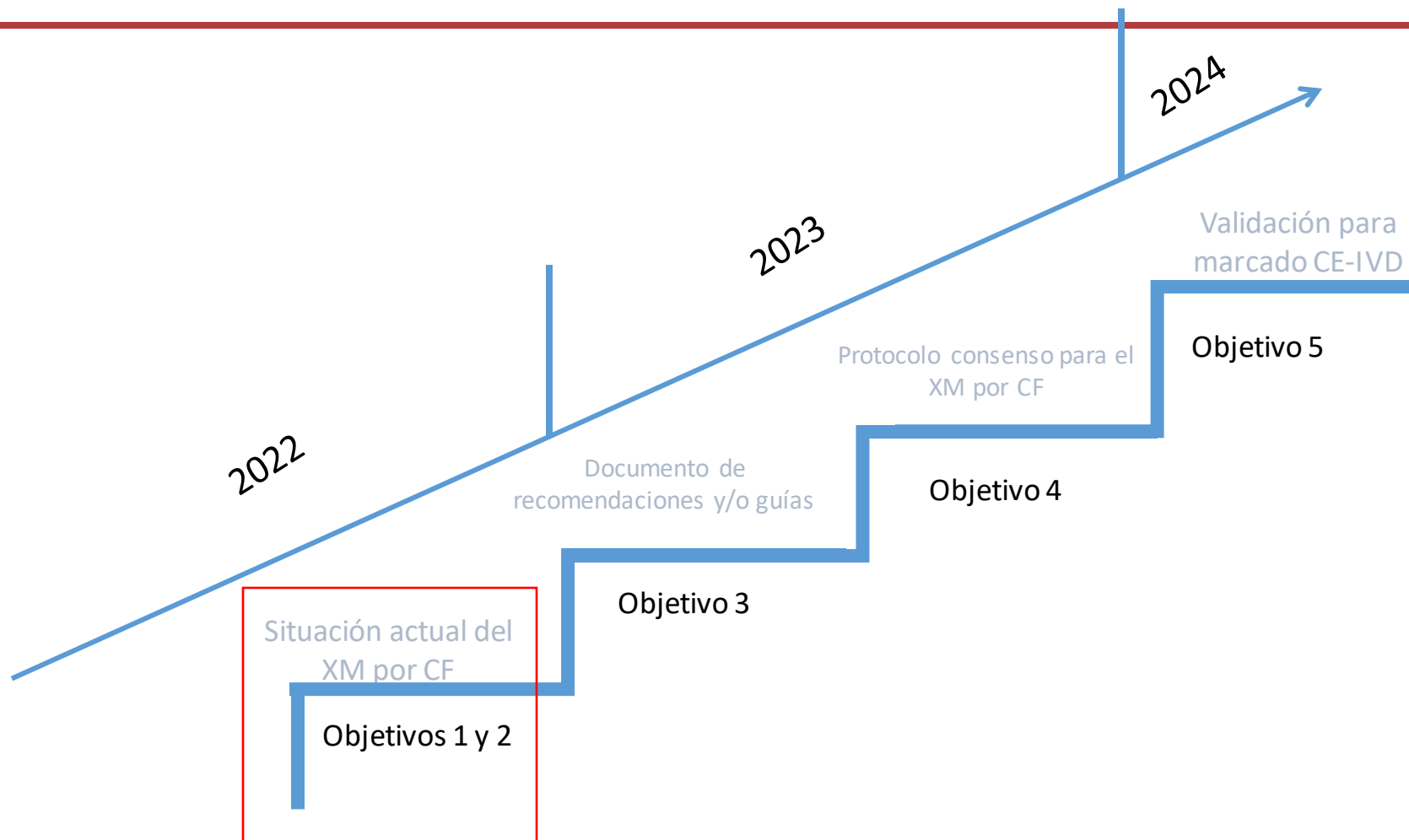
**4**

- Establish process to monitor performances across time and ensure the method continues to meet requirements.

\*Criteria must be defined before generating experimental data



# Objetivos



# Objetivos

## Objetivos iniciales (a corto plazo) del estudio:

A través de la colaboración de laboratorios clínicos que actualmente generan resultados de la prueba cruzada por citometría de flujo, pretendemos:

1. **Identificar el estado actual** de los principales aspectos técnicos y metodológicos de la prueba cruzada por citometría de flujo, susceptibles de variabilidad entre laboratorios.
2. **Detallar y clasificar los materiales, reactivos y/o equipamientos** actualmente utilizados para la prueba cruzada por citometría de flujo, permitiendo identificar fases de la validación analítica susceptibles de intervención.

## Objetivos posteriores (a medio/largo plazo):

3. Elaborar un documento de recomendaciones y/o guías donde se definan los criterios y requerimientos metodológicos para la validación de la técnica.
4. Proponer actividades colaborativas que permitan generar información experimental para la estandarización de la prueba cruzada por citometría en laboratorios acreditados y que sirvan de base para la validación de la técnica.
5. Establecer una propuesta que permita establecer una metodología de trabajo para la validación de LDT que sea aplicable a otras técnicas



Encuesta online

# Metodología



PRE-  
ANALÍTICA



**Aspectos técnicos**

- 1.1. Recogida de muestras
- 1.2. Transporte de la muestra

**Reactivos**

- 1.3. Reactivos para la prueba cruzada por citometría de flujo
  - 1.3.1. Anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos
  - 1.3.4. Reactivo para evaluar la viabilidad
  - 1.3.5. Bloqueo de los receptores Fc en los linfocitos B
  - 1.3.6. Tampones requeridos durante la técnica

ANALÍTICA



**Aspectos técnicos**

- 2.1. Aislamiento de PBMC
- 2.2. Tratamiento con Pronasa
- 2.3. Muestras de suero
- 2.4. Controles negativos y positivos
- 2.5. Formato de preparación/adquisición de la muestra
- 2.6. Ratio células / suero y marcaje

**Calibración citómetro**

- 2.7.1. Citómetro
- 2.7.2. Estándares de fluorescencia
- 2.7.3. Frecuencia de comprobación de la compensación

POST-  
ANALÍTICA



**Informe de resultados**

- 3.1.1. Criterios de aceptación según controles:
- 3.1.2. Criterios para la interpretación de los resultados
- 3.2.1. Detalles incluidos en los informes



# Resultados de la encuesta



# Participación

- 30/05/2022 – 30/08/2022: 17 centros
- > 1 año XM-CMF
- 14/17 centros participan GECLID
- Donante vivo/ Cadáver

**Número aproximado de determinaciones al año de donante vivo:** (*numeroxyyear*)

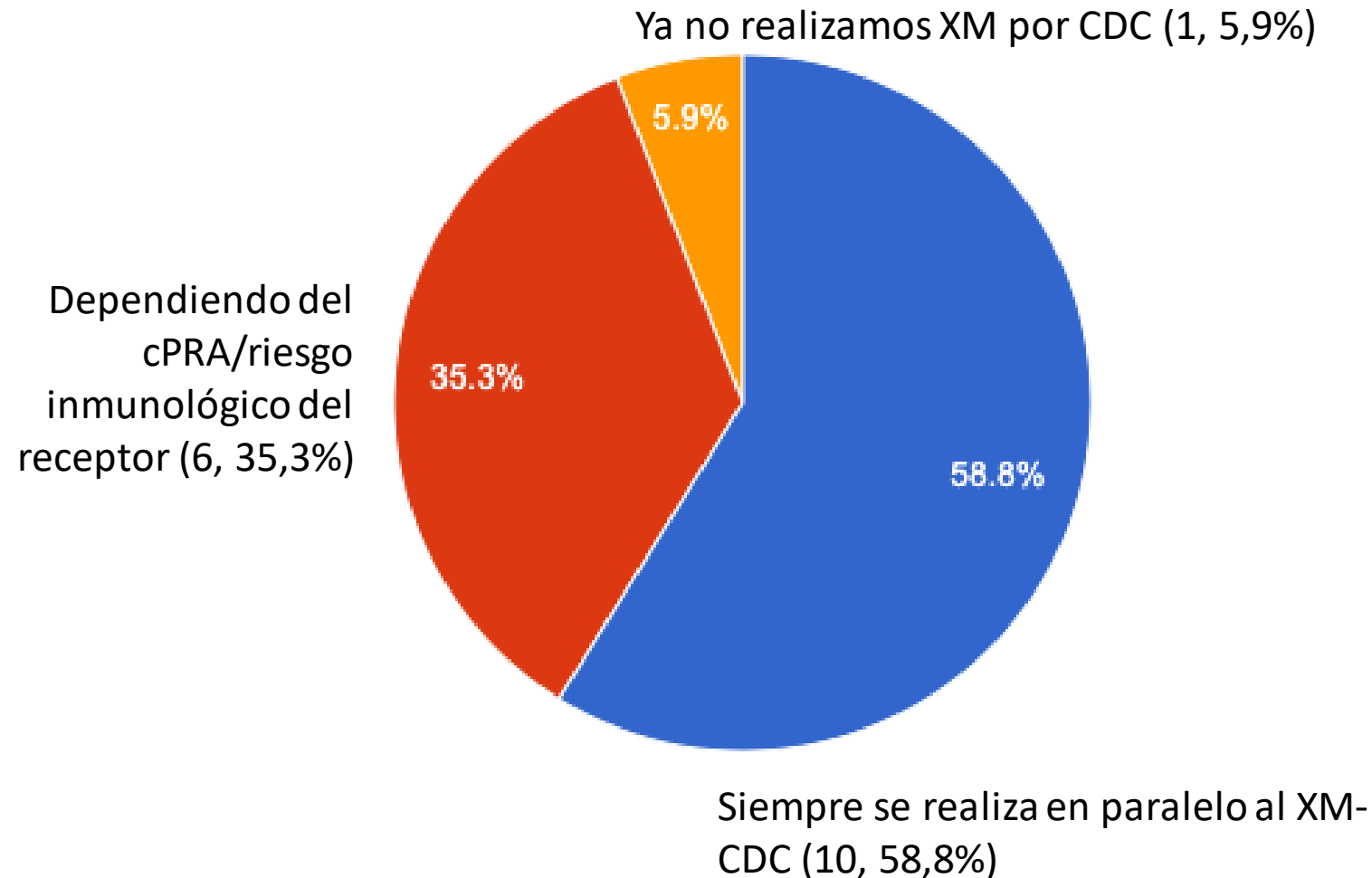
| Total Count (N) | Missing* | Unique | Min  | Max   | Mean  | StDev | Sum    | Percentile |      |      |             |       |       |       |
|-----------------|----------|--------|------|-------|-------|-------|--------|------------|------|------|-------------|-------|-------|-------|
|                 |          |        |      |       |       |       |        | 0,05       | 0,10 | 0,25 | 0,50 Median | 0,75  | 0,90  | 0,95  |
| 17              | 0 (0,0%) | 15     | 0,00 | 93,00 | 30,71 | 33,70 | 522,00 | 0,80       | 3,40 | 5,00 | 15,00       | 40,00 | 89,40 | 90,60 |

**Número aproximado de determinaciones al año de donante cadáver:** (*numeroxyyear\_2*)

| Total Count (N) | Missing*                  | Unique | Min   | Max    | Mean  | StDev  | Sum    | Percentile |       |       |             |       |        |        |
|-----------------|---------------------------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|------------|-------|-------|-------------|-------|--------|--------|
|                 |                           |        |       |        |       |        |        | 0,05       | 0,10  | 0,25  | 0,50 Median | 0,75  | 0,90   | 0,95   |
| 10              | <a href="#">7 (41,2%)</a> | 8      | 15,00 | 560,00 | 96,00 | 164,48 | 960,00 | 17,25      | 19,50 | 28,75 | 50,00       | 57,50 | 137,00 | 348,50 |



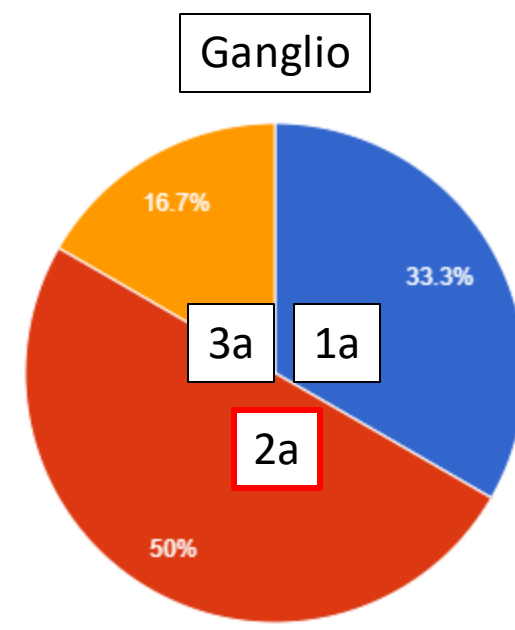
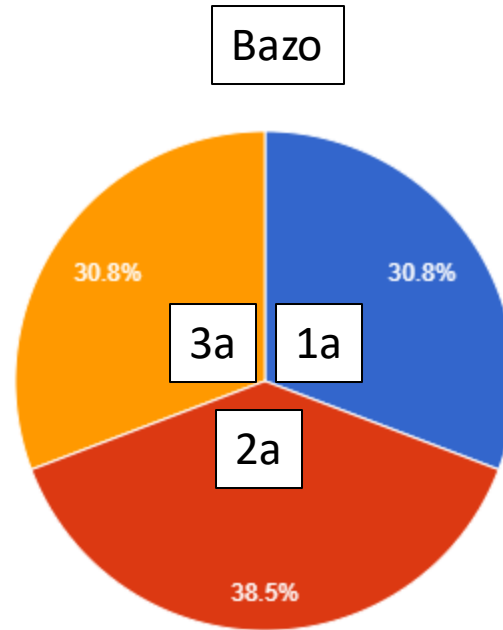
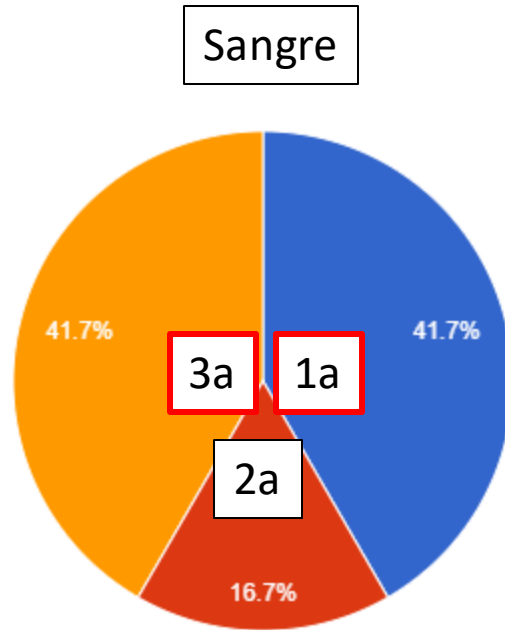
# La prueba cruzada por citometría de flujo y por citotoxicidad (CDC):



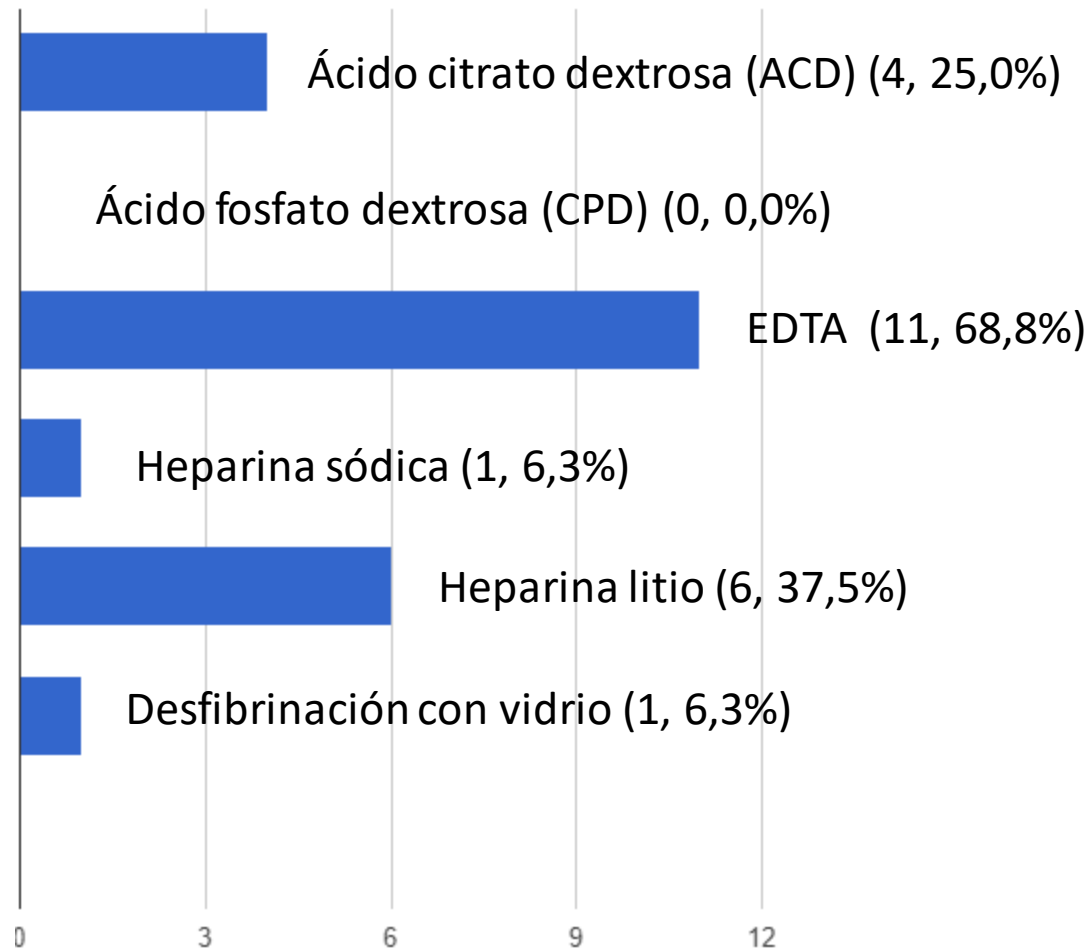
# FASE PRE-ANALÍTICA



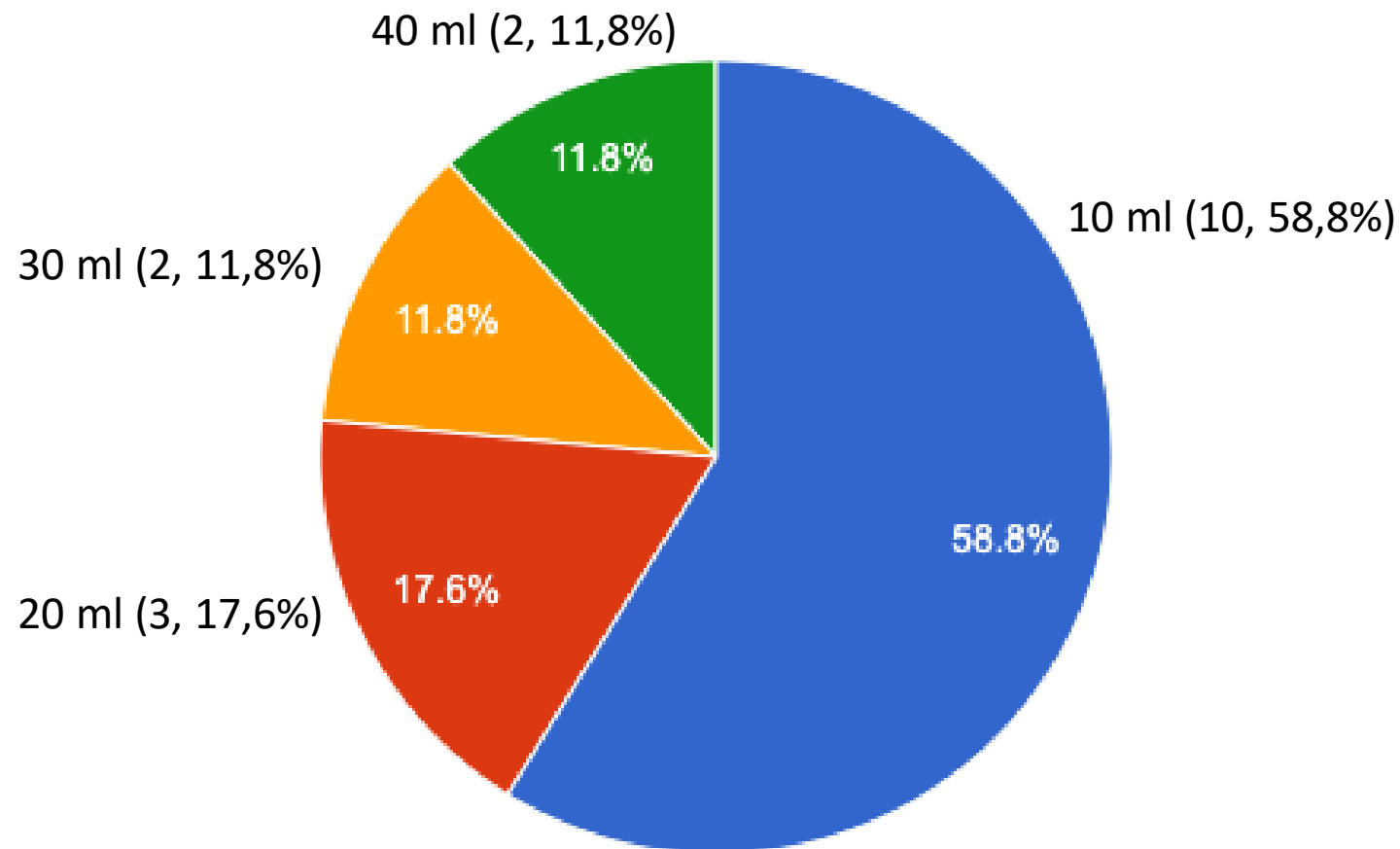
# Muestra celular procesadas:



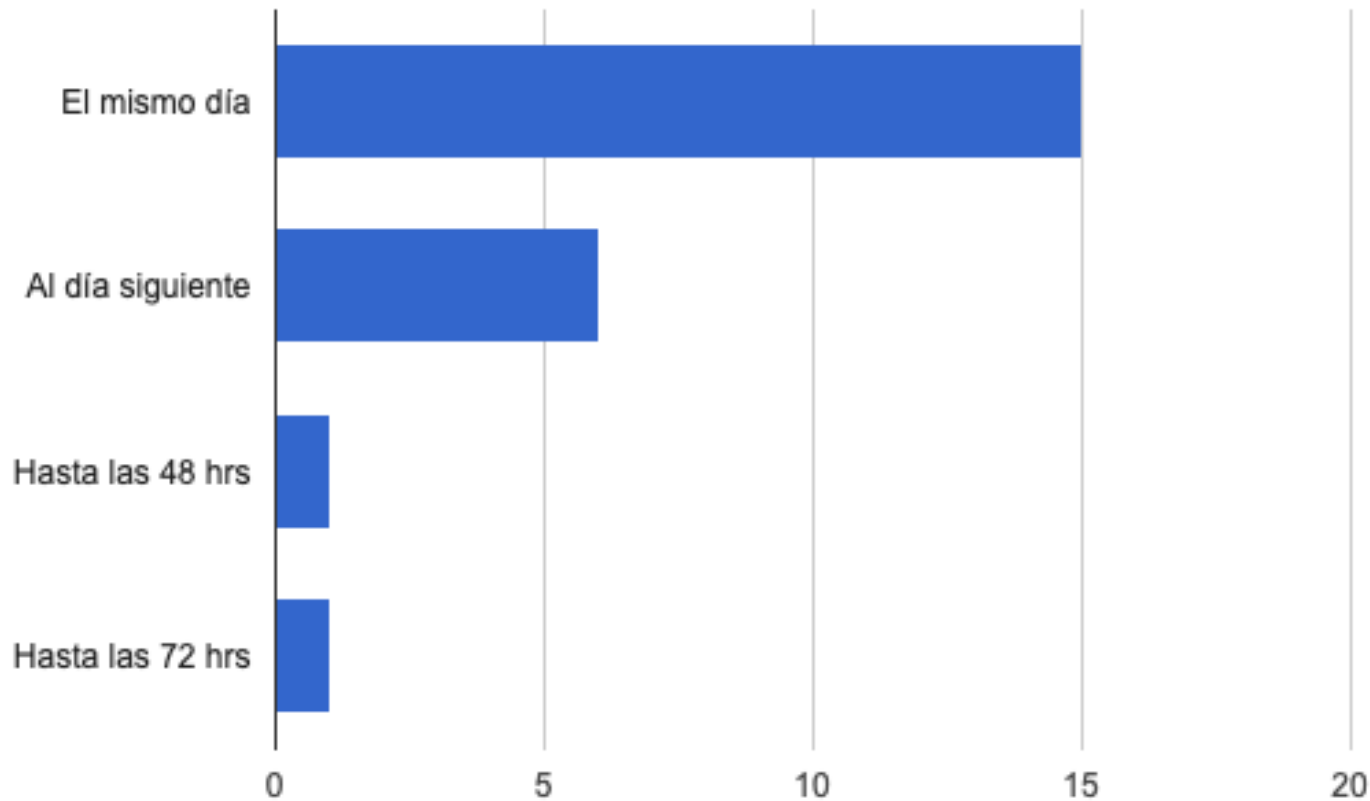
## 1.1.1. Tipo de anticoagulante utilizado en las muestras de sangre periférica:



## 1.1.2. Volumen mínimo de sangre periférica del donante para la separación de PBMCs:



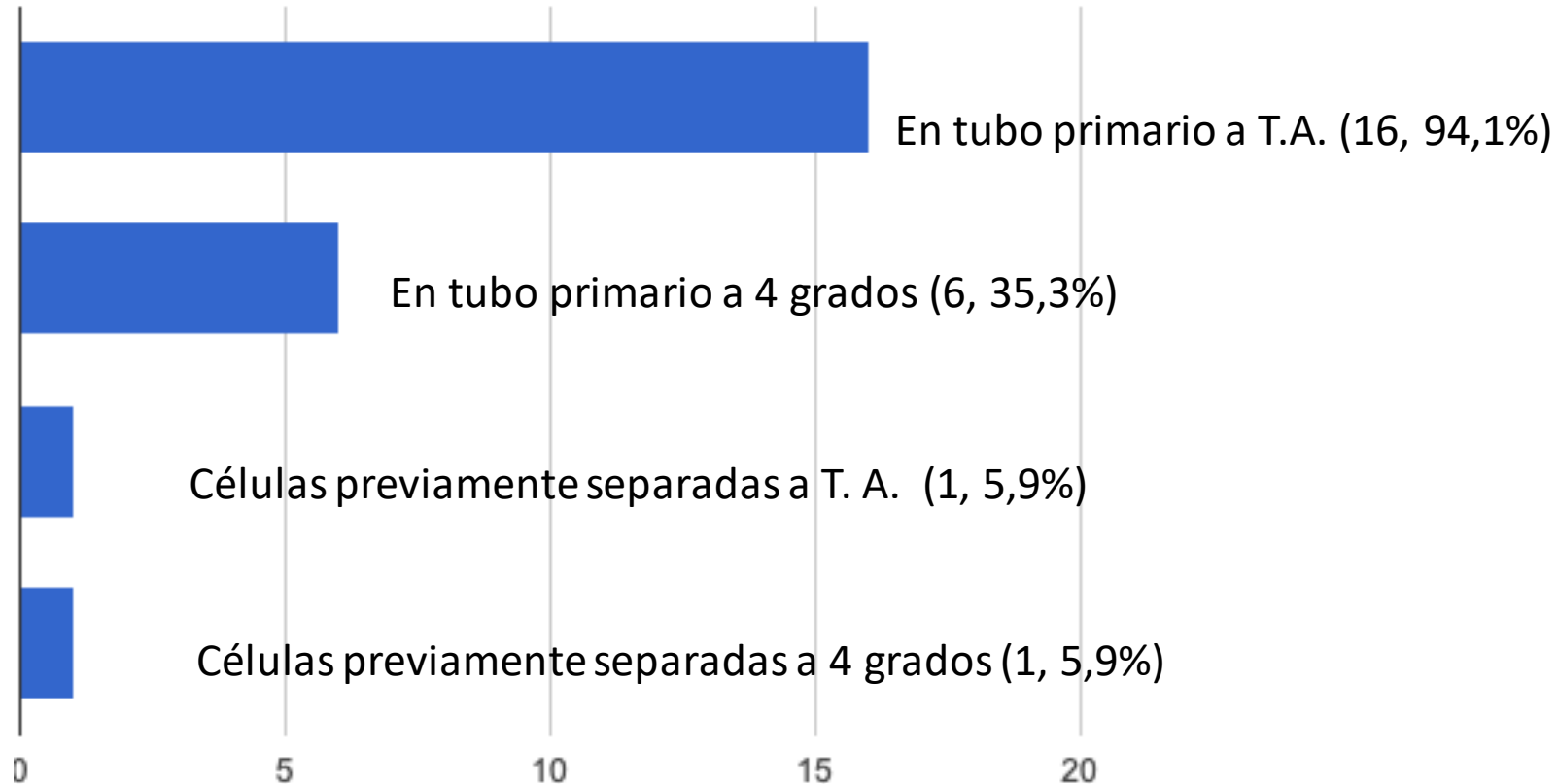
## 1.1.3. Tiempo de procesamiento de la muestra desde su extracción



**Counts/frequency:** El mismo día (15, 88,2%), Al día siguiente (6,35,3%), Hasta las 48 hrs (1, 5,9%), Hasta las 72 hrs (1, 5,9%)



## 1.2.1 Condiciones de transporte de muestras desde otro centro

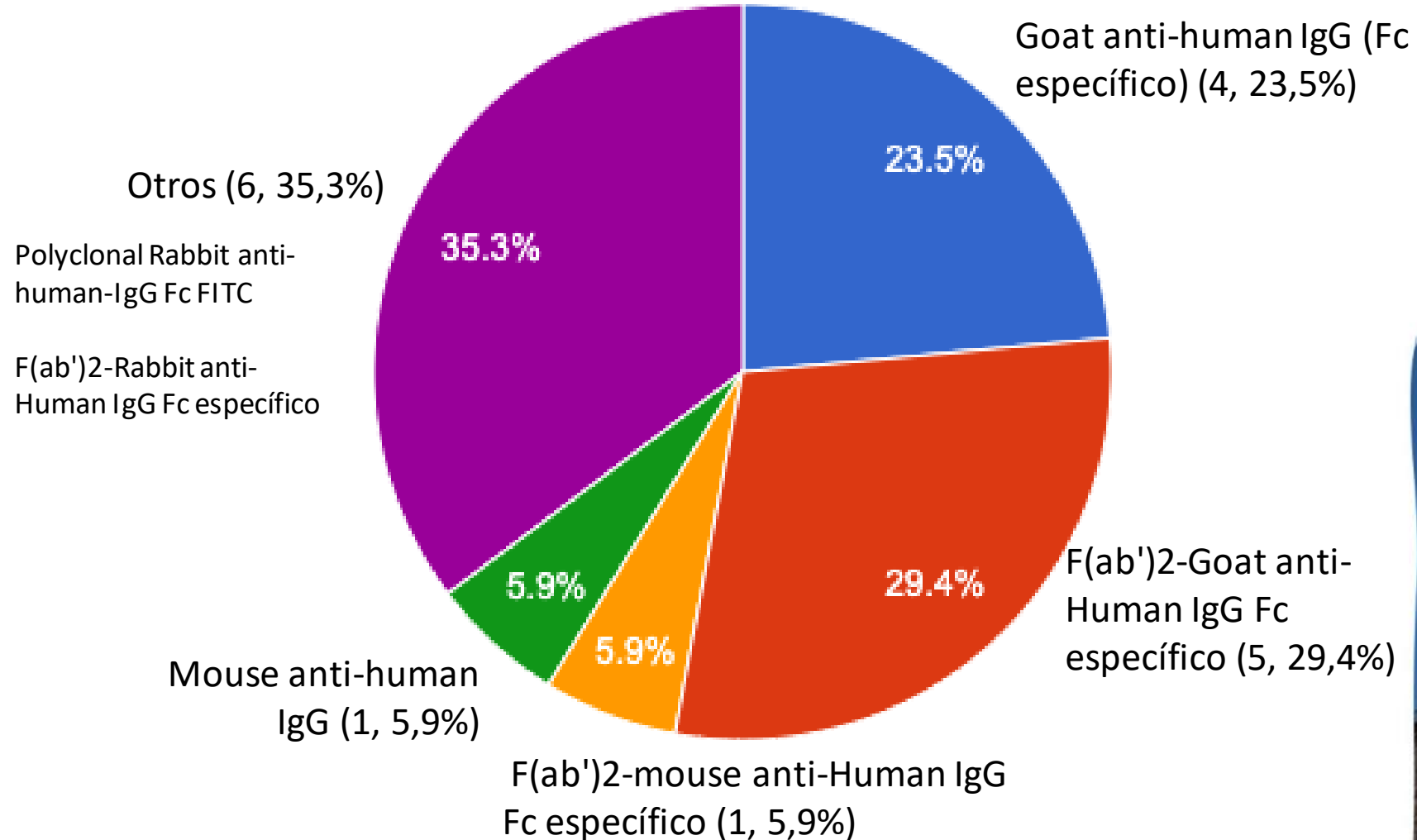


# FASE ANALÍTICA

## 1. REACTIVOS

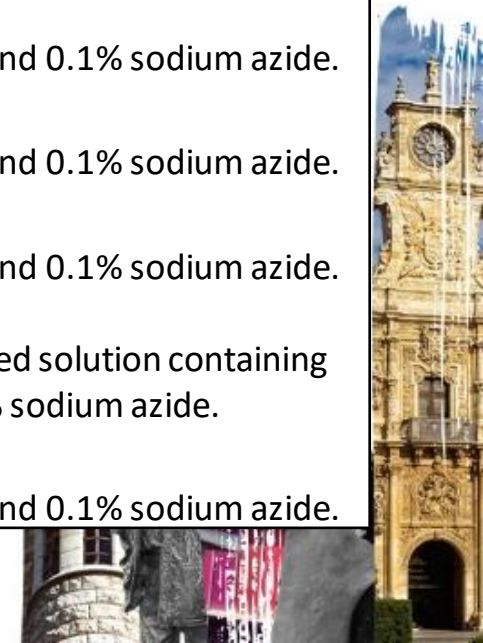


### 1.3.1.1. Tipo de anti-IgG :

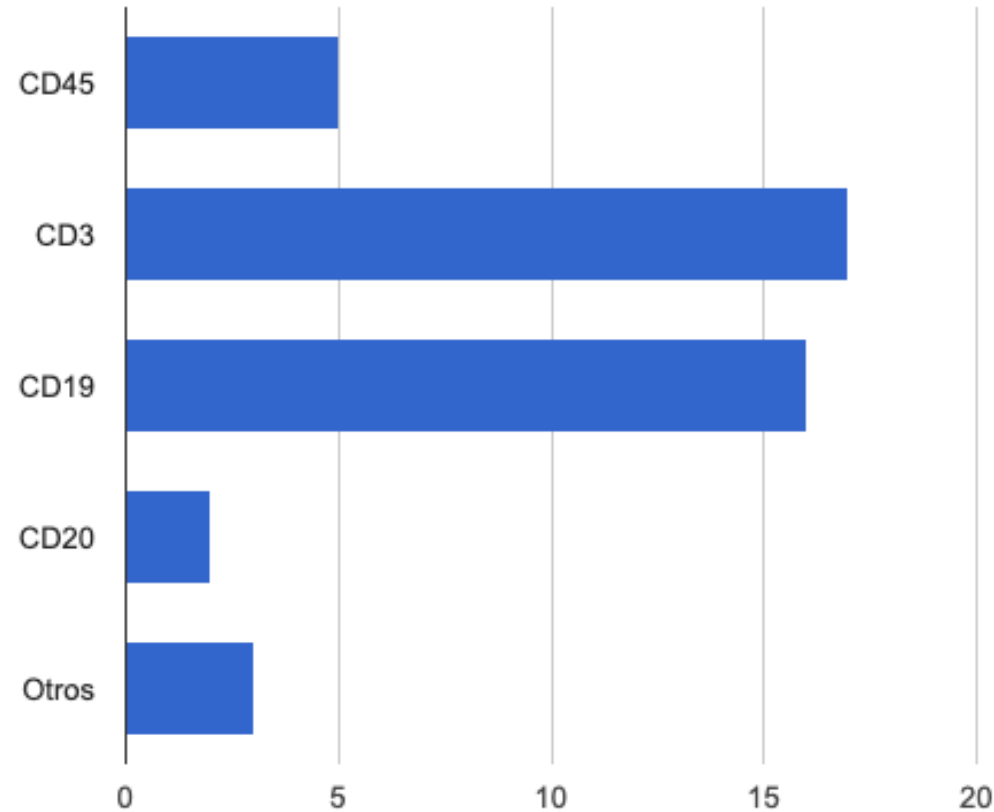


## Resultados (1): Anticuerpos monoclonales en XM-CMF

| Target    | Clone                                  | Company        | Specification              | Category | Available conjugates | Preservation medium                                               |
|-----------|----------------------------------------|----------------|----------------------------|----------|----------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Anti- IgG | Polyclonal Rabbit                      | Dako           | Rabbit F(ab') <sub>2</sub> | CE_IVD   | FITC                 | Aqueous buffered solution containing BSA and 0,1% sodium azide.   |
| Anti- IgG | Polyclonal Goat Fc specific            | Invitrogen     | F(ab') <sub>2</sub> -Goat  | RUO      | FITC                 | PBS, 0,2% BSA and 0.1% sodium azide.                              |
| Anti- IgG | Polyclonal Rabbit Fc specific          | Invitrogen     | Goat IgG                   | RUO      | FITC                 | PBS, 0,4% BSA and 0.1% sodium azide.                              |
| Anti- IgG | Polyclonal Rabbit Fc specific          | Jackson Immuno | Rabbit F(ab') <sub>2</sub> | RUO      | FITC                 | PBS, 0,2% BSA and 0.1% sodium azide.                              |
| Anti- IgG | Monoclonal Mouse Fc specific           | Invitrogen     | Mouse IgG                  | RUO      | FITC                 | PBS, 0,2% BSA and 0.1% sodium azide.                              |
| Anti- IgG | G18-145 - Monoclonal Mouse Fc specific | BD             | Mouse IgG1, κ              | RUO      | FITC                 | Aqueous buffered solution containing BSA and ≤0.09% sodium azide. |
| Anti- IgG | Polyclonal Goat Fc specific            | ND*            | Goat IgG                   | CE       | PE                   | PBS, 0,2% BSA and 0.1% sodium azide.                              |



## 1.3.3. Panel de anticuerpos poblaciones linfocitarias:



**Counts/frequency:** CD45 (5, 29,4%), CD3 (17, 100,0%), CD19 (16, 94,1%), CD20 (2, 11,8%), Otros (3, 17,6%)



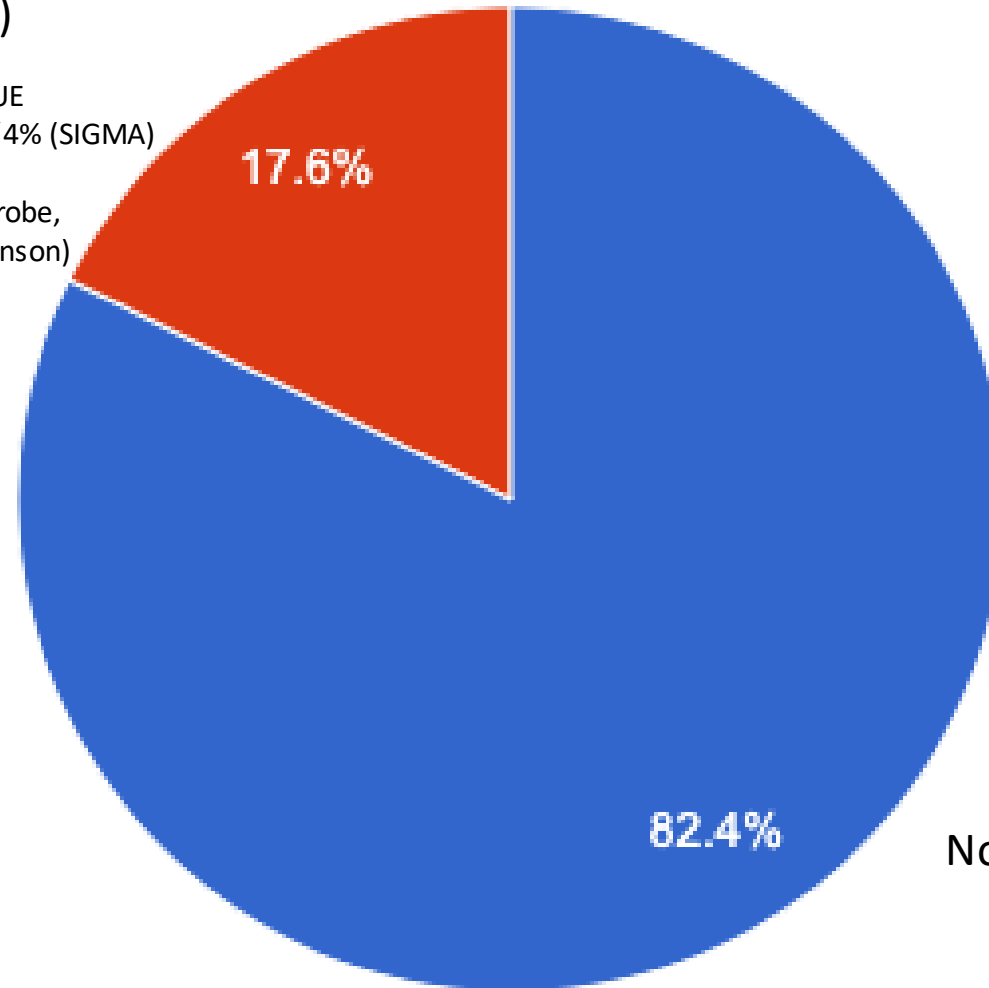
## Resultados (2): Anticuerpos monoclonales en XM-CMF

| Target | Clone  | Company | Specification        | Category | Available conjugates     | Preservation medium                                               |
|--------|--------|---------|----------------------|----------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| CD3    | SK7    | BD      | Mouse BALB/c IgG1, κ | CE_IVD   | PE, PERCP, APC, APC-H7   | PBS with gelatin and 0.1% sodium azide.                           |
| CD3    | UCTH1  | BD      | Mouse BALB/c IgG1, κ | RUO      | PE, APC                  | Aqueous buffered solution containing BSA and ≤0.09% sodium azide. |
| CD3    | UCTH1  | BC      | Mouse IgG1           | CE_IVD   | FITC, ECD, APC           | PBS, 0,2% BSA and 0.1% sodium azide.                              |
| CD19   | SJ25C1 | BD      | Mouse BALB/c IgG1, κ | CE_IVD   | FITC, PECY7              | PBS with gelatin and 0.1% sodium azide.                           |
| CD19   | SJ25C1 | BD      | Mouse BALB/c IgG1, κ | RUO(GMP) | APC-H7                   | Aqueous buffered saline with gelatin and 0.1% sodium azide.       |
| CD19   | J3-119 | BC      | Mouse IgG1           | CE       | FITC, PC5, APC, APC-A750 | PBS, 0,2% BSA and 0.1% sodium azide.                              |
| CD19   | J3-119 | BC      | Mouse IgG1           | ASR      | KrO                      | PBS, 0,2% BSA and 0.1% sodium azide.                              |
| CD20   | L27    | BD      | Mouse BALB/c IgG1, κ | CE_IVD   | PE                       | PBS with gelatin and 0.1% sodium azide.                           |
| CD45   | 2D1    | BD      | Mouse IgG1, κ        | CE_IVD   | PERCP, APC-H7            | PBS with gelatin and 0.1% sodium azide.                           |
| CD45   | HI30   | BD      | Mouse IgG1, κ        | RUO      | PERCP-CY 5.5             | Aqueous buffered solution containing BSA and ≤0.09% sodium azide. |
| CD45   | J33    | BC      | Mouse IgG1           | CE       | PC7                      | PBS, 0,2% BSA and 0.1% sodium azide.                              |

## 1.3.4. Uso de algún reactivo para evaluar la viabilidad

Si (3, 17,6%)

- TRYPAN BLUE  
SOLUTION 0'4% (SIGMA)
- 7AAD (Viaprobe,  
Becton-Dickinson)



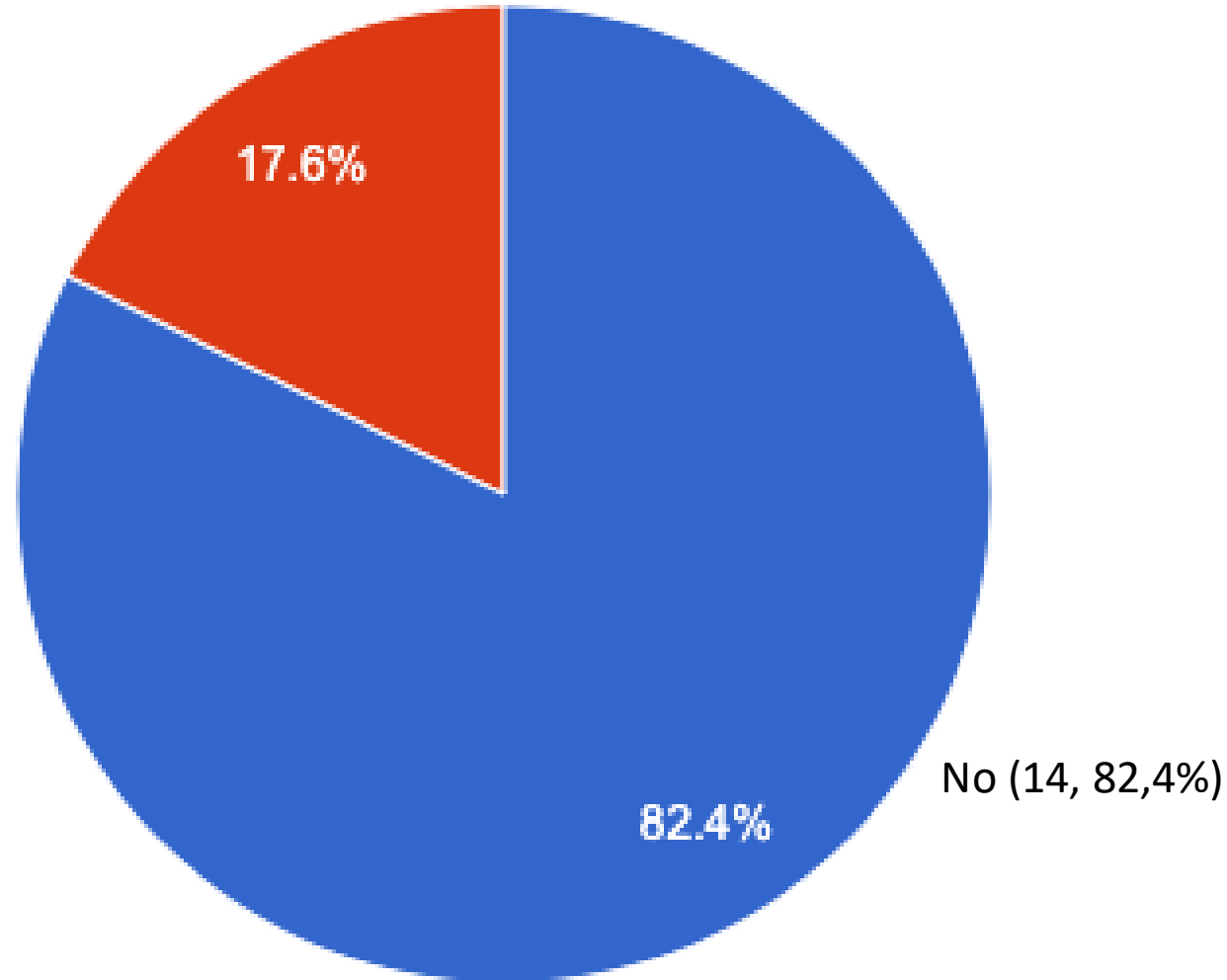
No (14, 81,4%)



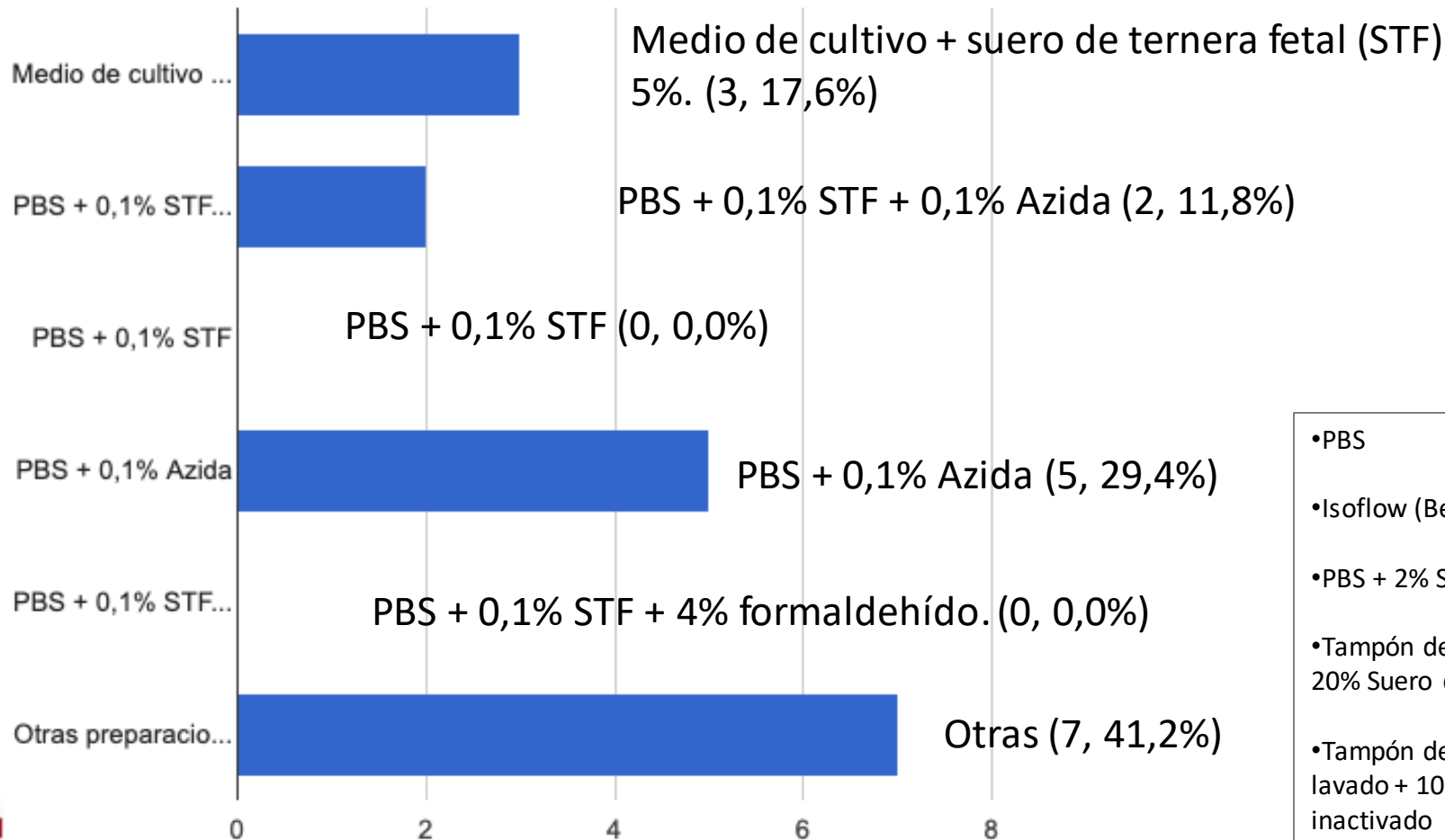
## 1.3.5. Bloqueo de los receptores Fc:

Sí (3, 17,6%)

- Suero de ternera fetal 20% y complemento de conejo inactivado 10%
- Rat serum (invitrogen)
- Fragmentos humanos Fc



## 1.3.6. Tampones requeridos durante la técnica:



- PBS
- Isoflow (Beckman Coulter)
- PBS + 2% SFB
- Tampón de lavado: 80% BD FACSFlow + 20% Suero de Ternera Fetal inactivado
- Tampón de incubación: Tampón de lavado + 10% Complemento de conejo inactivado
- PBS + 20% STF



## Resultados (3): Tampones utilizados en XM-CMF

| Name                       | Company          | Category |
|----------------------------|------------------|----------|
| PBS                        | Multiple options | IVD      |
| Isoflow Sheath Fluid       | BC               | CE_IVD   |
| Fetal Bovine Serum         | Multiple options | IVD      |
| BD FACSTFlow™ Sheath Fluid | BD               | RUO      |
| Rabbit complement          | BAG diagnostics  | CE_IVD   |
| RPMI 1640                  | Multiple options | IVD      |
| Rabbit serum               | Multiple options | RUO      |

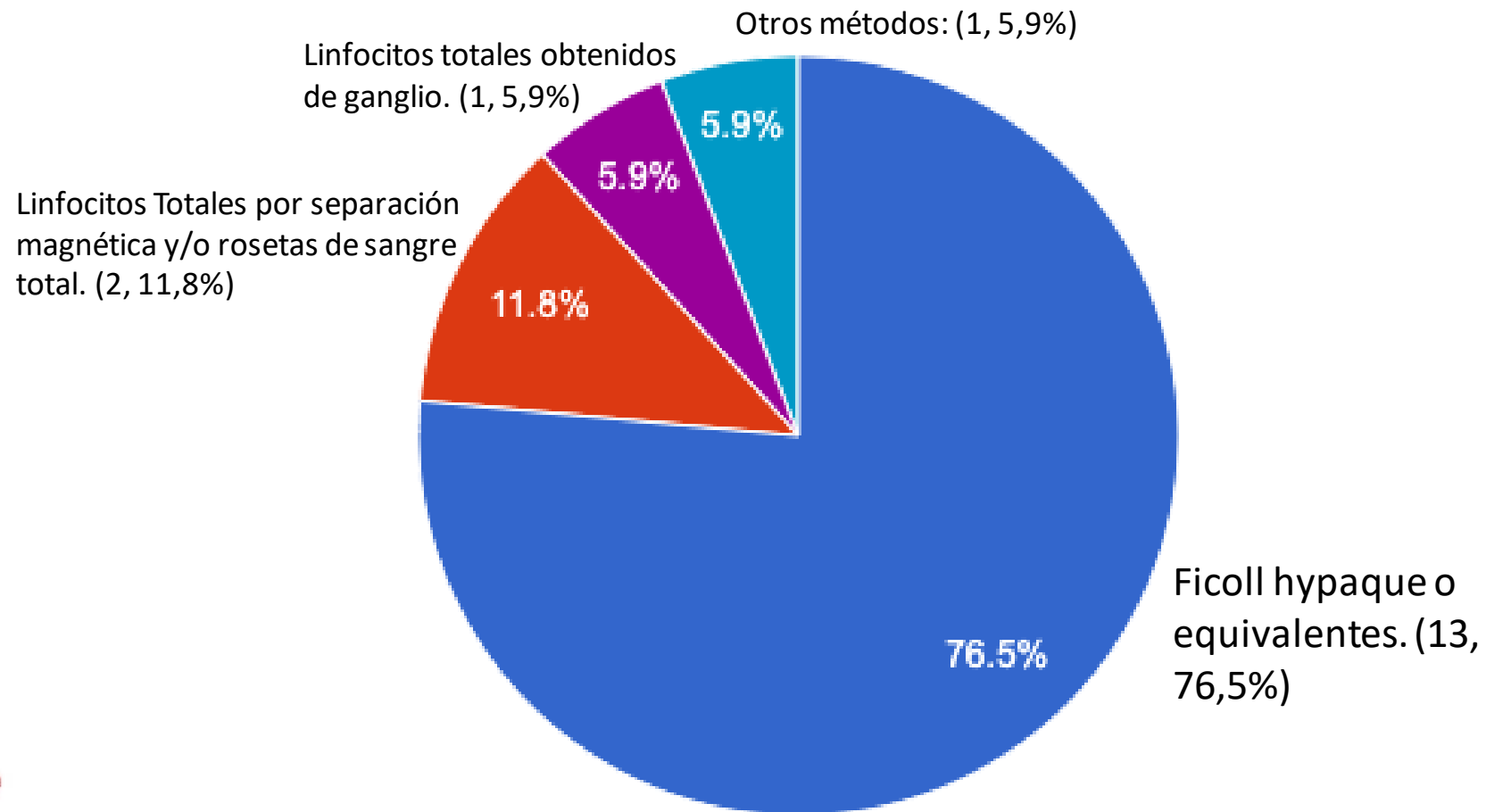


# FASE ANALÍTICA

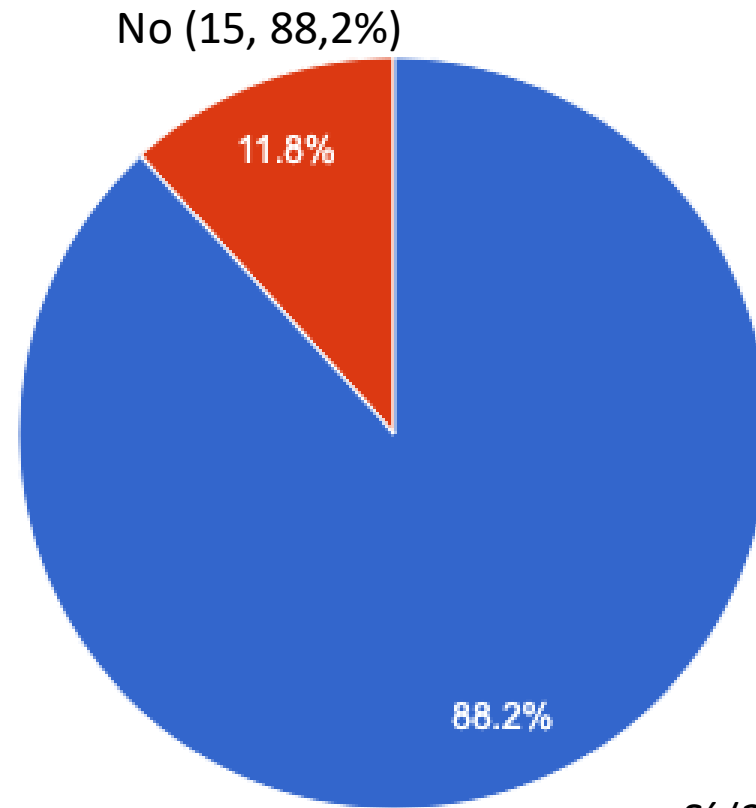
## 2. METODOLOGÍA



## 2.1.1. Tipo celular para la prueba cruzada por citometría:



## 2.2.1. ¿Realiza tratamiento de las células con pronasa?

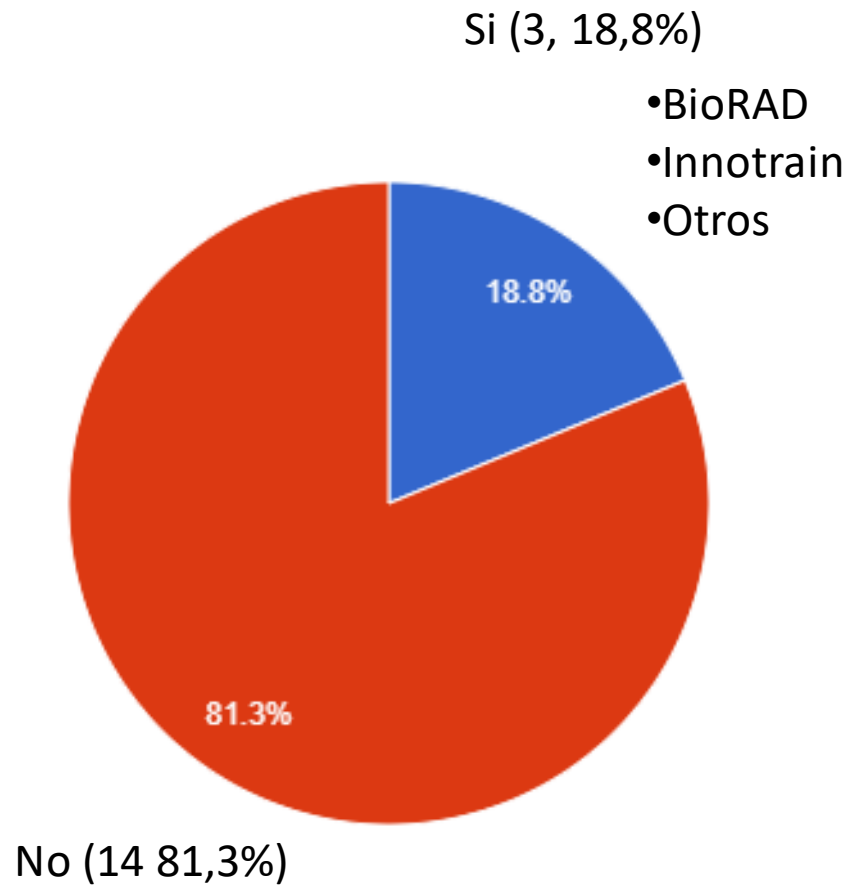


Sí (2, 11,8%)

[NO en paralelo la prueba cruzada con células sin pronasa y con pronasa]

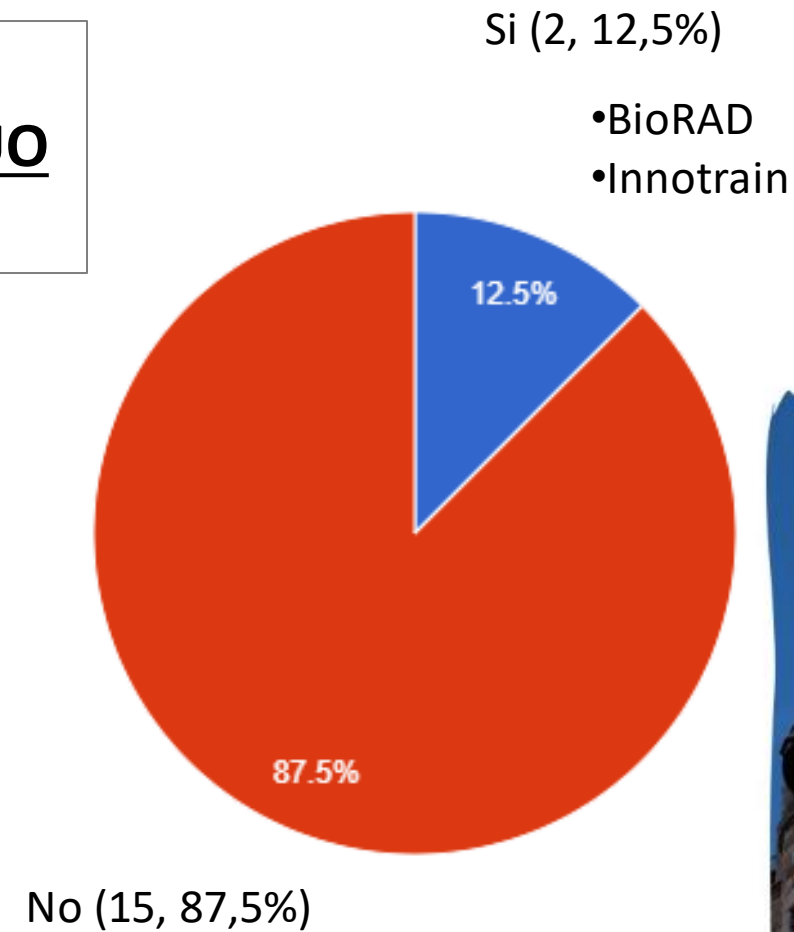


## 2.4.1. control NEGATIVO.

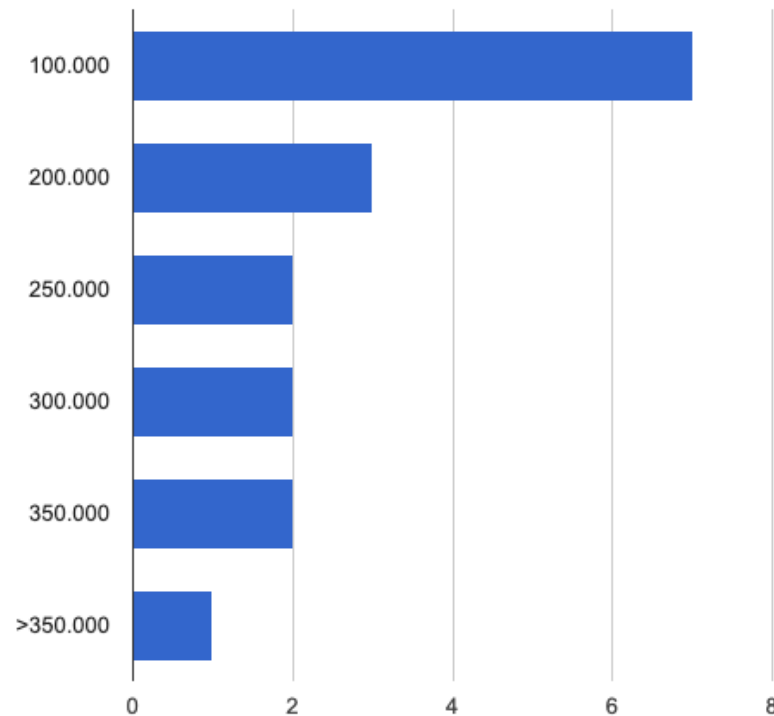


RUO

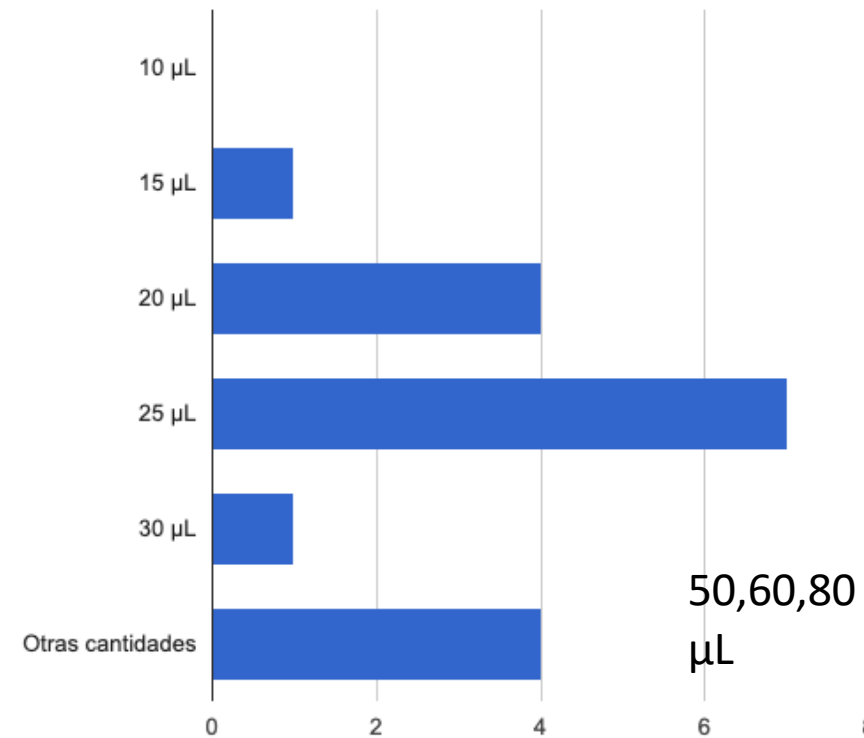
## 2.4.2 control POSITIVO



## 2.6.1. Linfocitos por tubo/pocillo. 2.6.1. Suero por tubo/pocillo:



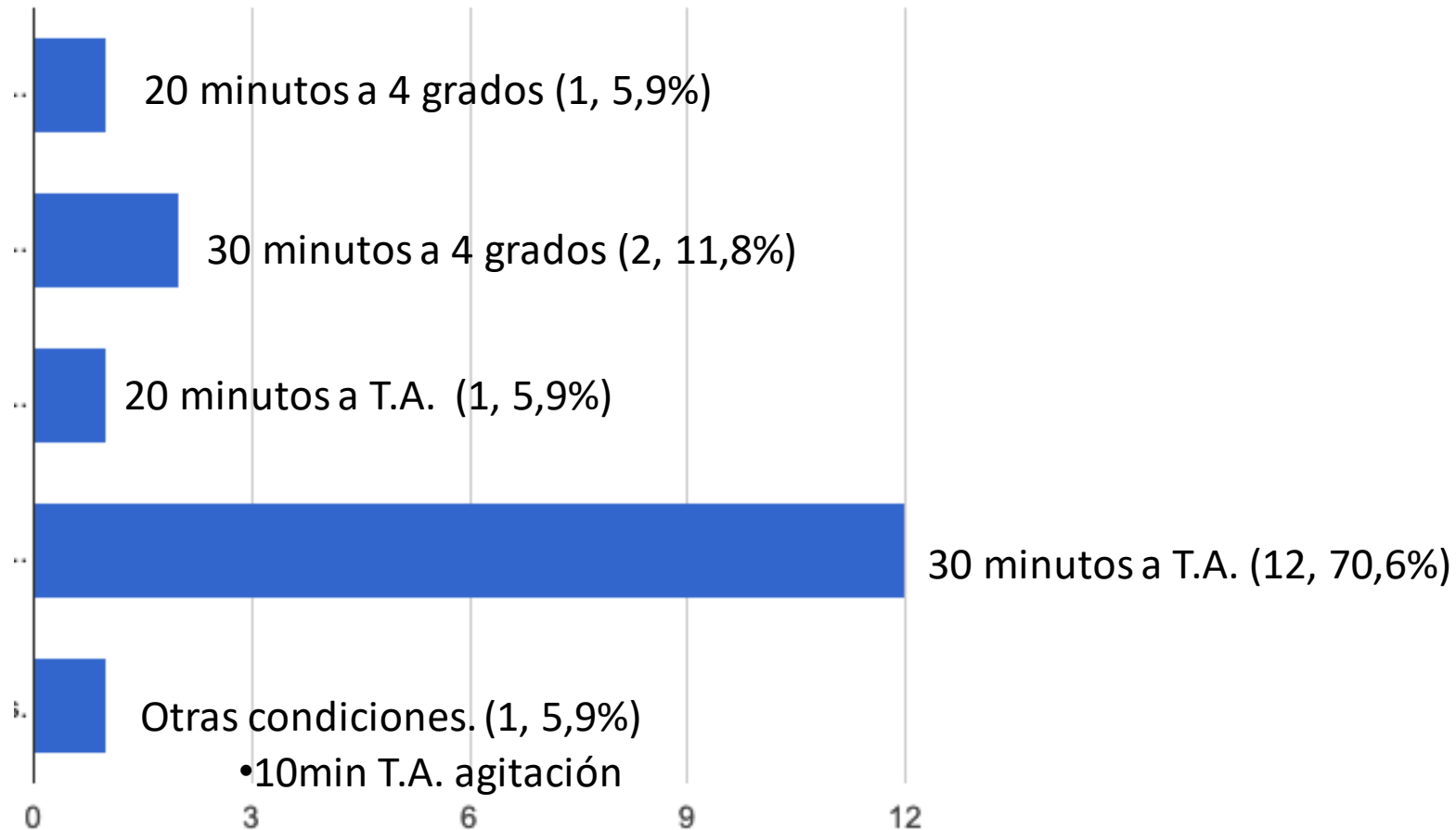
**Counts/frequency:** 100.000 (7, 41,2%), 200.000 (3, 17,6%), 250.000 (2, 11,8%), 300.000 (2, 11,8%), 350.000 (2, 11,8%), >350.000 (1, 5,9%)



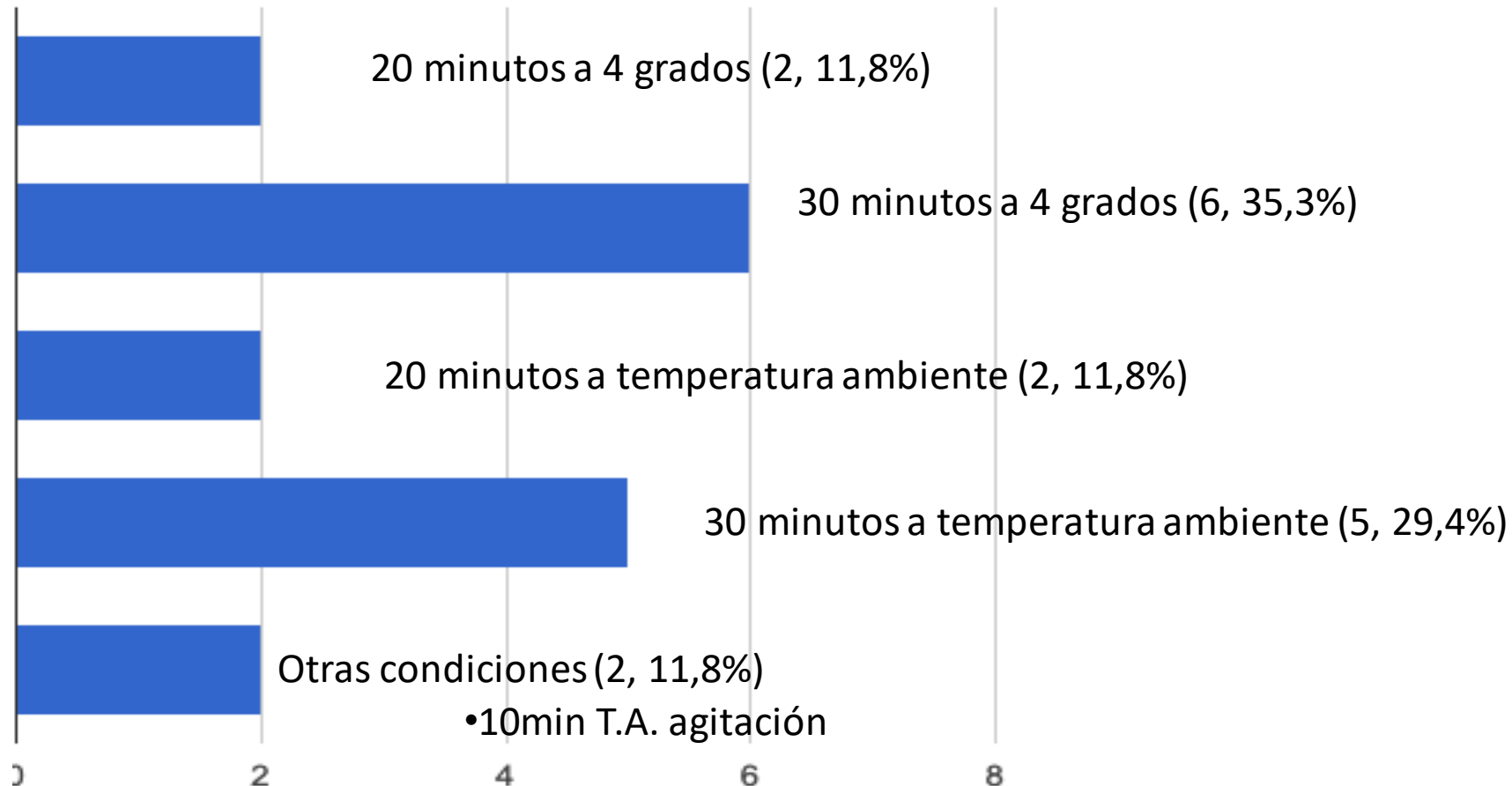
**Counts/frequency:** 10 µL (0, 0,0%), 15 µL (1, 5,9%), 20 µL (4, 23,5%), 25 µL (7, 41,2%), 30 µL (1, 5,9%), Otras cantidades (4, 23,5%)



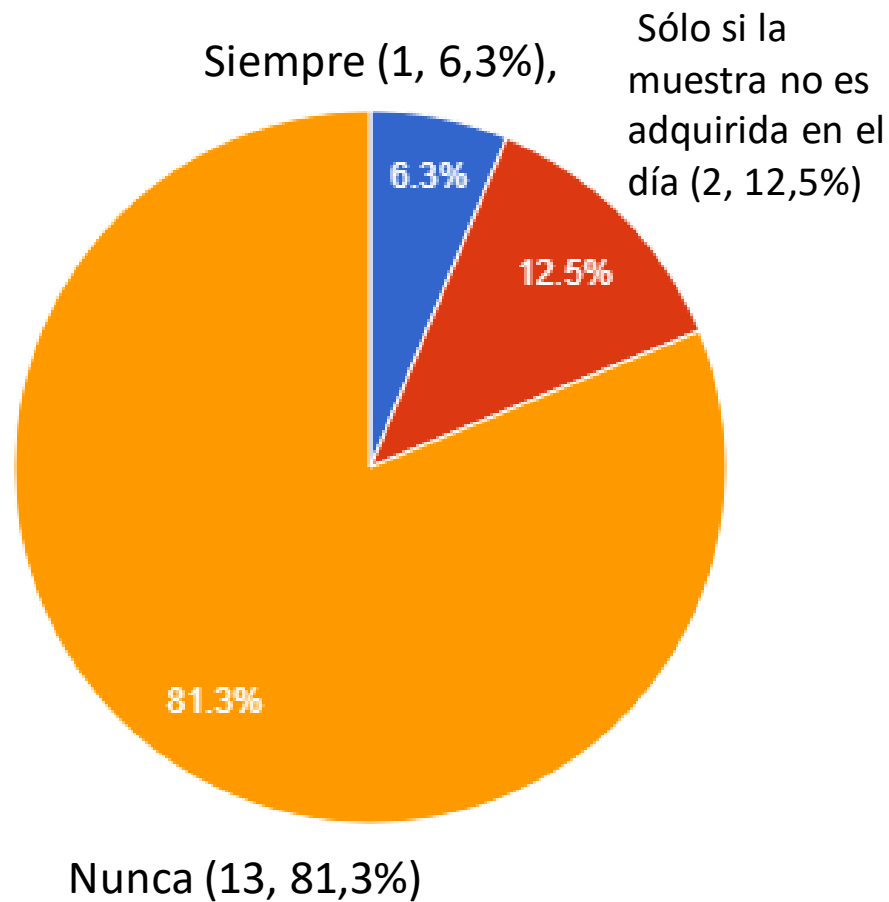
## 2.6.3. Temperatura y tiempo de la incubación entre células/suero:



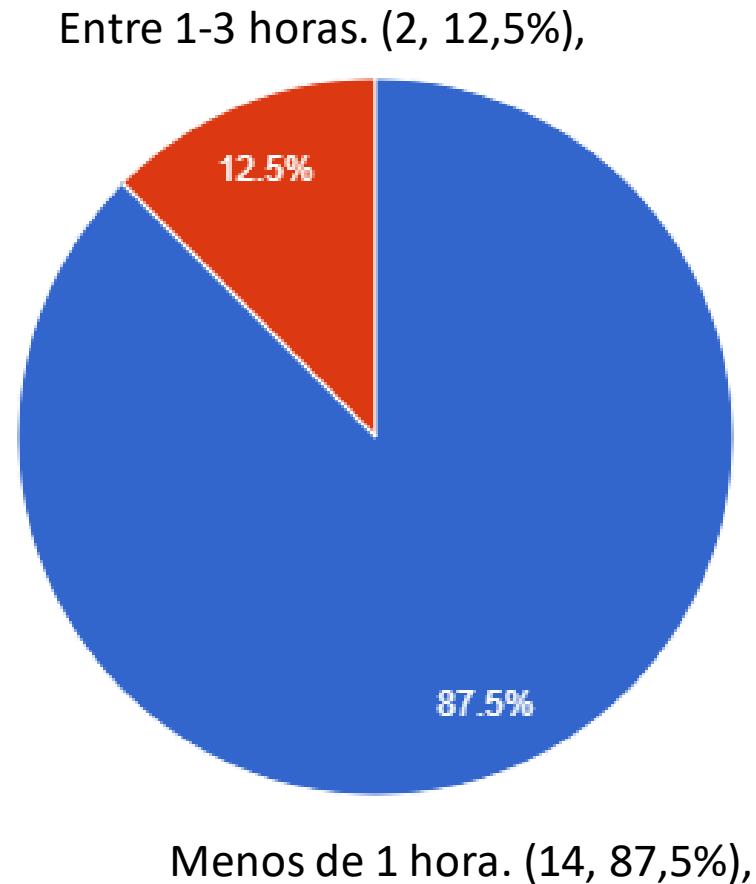
## 2.6.4. Temperatura y tiempo de la marcaje con anticuerpos:



## 2.6.5. Fijación de las células:



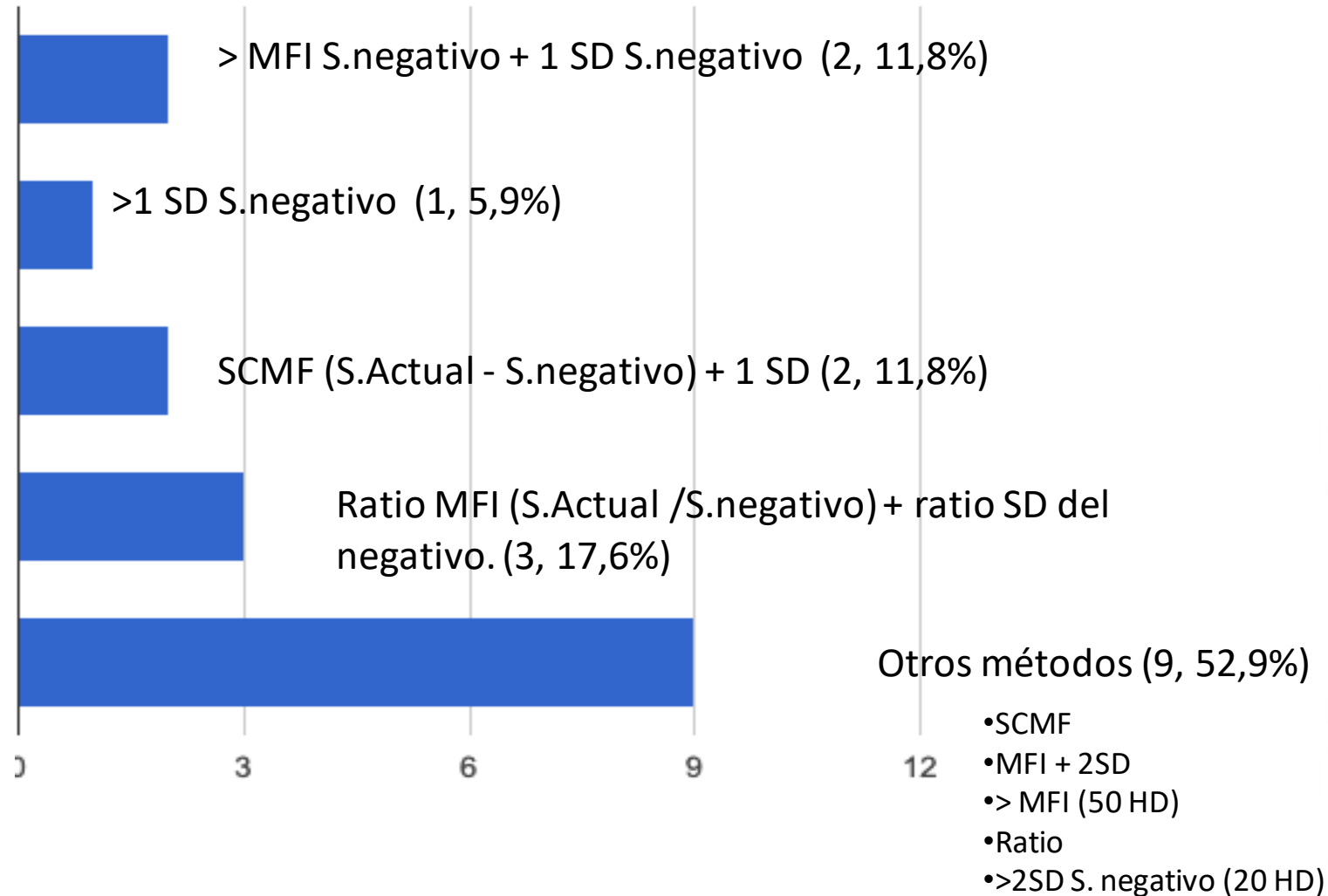
## 2.6.6. Tiempo adquisición al citómetro:



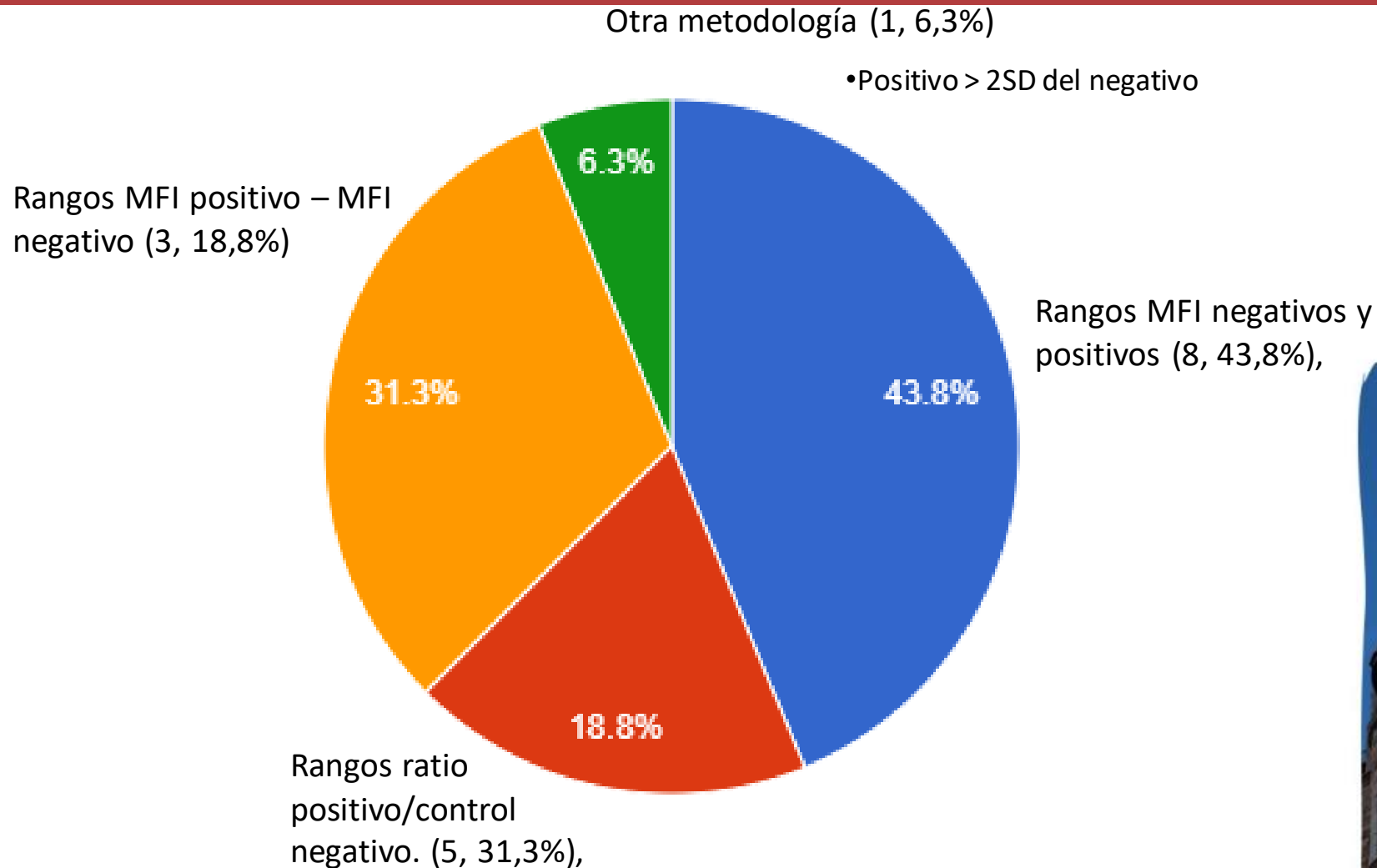
# FASE POST-ANALÍTICA



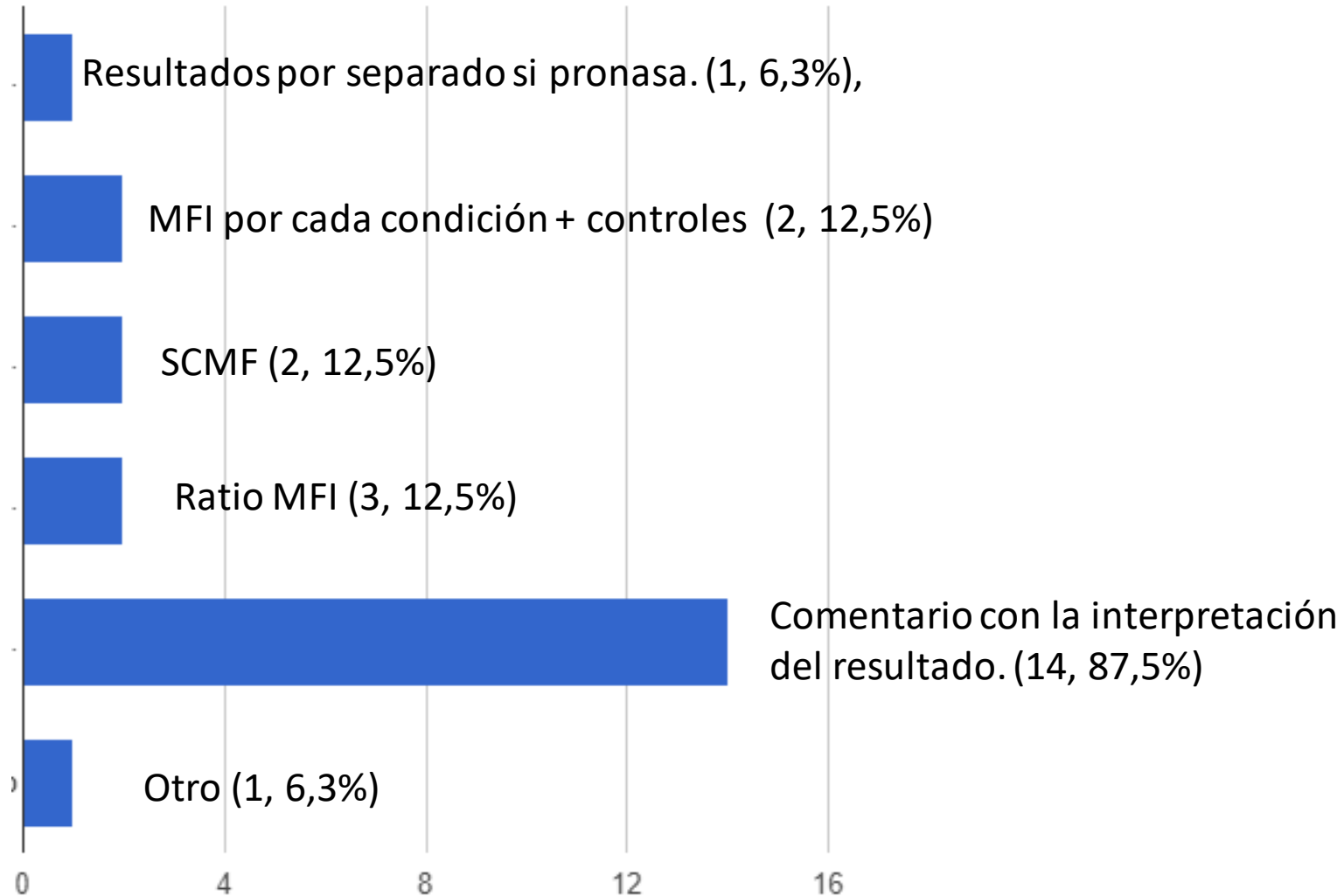
## 3.1.1. Punto de corte de la prueba cruzada por citometría de flujo:



## 3.1.2.. Criterios de aceptación según controles:



## 3.2.1. Detalles del informe:



# Resumen de los resultados

| Fase                                    | Descripción                             | Diferencias entre centros           | Susceptibles de Recomendación             |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------|
| PRE-ANALÍTICA                           | Aspectos técnicos                       | Volumen mínimo de sangre a procesar | Tipo de muestra donante cadáver           |
|                                         |                                         | Tiempo de procesamiento             | Tipo anticoagulante                       |
|                                         |                                         | Transporte muestras                 |                                           |
|                                         | Reactivos                               | Tipo de anti-IgG                    | Panel detección poblaciones linfocitarias |
|                                         |                                         | Titulación anticuerpos              | Viabilidad celular                        |
|                                         |                                         | Tipo de bloqueo Fc                  | Bloqueo receptores Fc                     |
|                                         |                                         | Tampones requeridos en la técnica   |                                           |
|                                         | ANALÍTICA                               | Aspectos técnicos                   | Muestras de suero a incluir en el ensayo  |
| Remover agregados del suero             |                                         |                                     | Tratamiento con pronasa                   |
| Control negativo                        |                                         |                                     | Tiempos incubación células/suero          |
| Control positivo                        |                                         |                                     | Fijación de las células                   |
| Ratio células/suero                     |                                         |                                     | Tiempo para adquisición                   |
| Temperatura incubación Acs monoclonales |                                         |                                     |                                           |
| Calibración citómetro                   |                                         | Compensación                        | Calibración del citómetro                 |
| POST-ANALÍTICA                          |                                         | Informe de resultados               | Puntos de corte                           |
|                                         | Criterios de aceptación según controles |                                     |                                           |



# Siguientes pasos

