

XVI FORUM DE CIENCIA Y TÉCNICA

RESUMEN

Título del trabajo: Diseño y optimización de un tubo policromático de citometría de flujo para inmunofenotipo linfocitario periférico

Autores y coautores:

Dra. Yaíma Zúñiga Rosales¹, Dr. Carlos Villegas Valverde², Dra. Bárbara Torres Rives¹, Téc. Evelyn Hernández Reyes¹

1- Centro Nacional de Genética Médica

2- INOR

Resumen del trabajo de forma estructurado:

Introducción: En los últimos años se ha elevado considerablemente el uso de la cuantificación y caracterización de las subpoblaciones linfocitarias mediante la citometría de flujo, por la extensión de sus aplicaciones no solo para el diagnóstico y seguimiento de las inmunodeficiencias, sino también, en el estudio de la autoinmunidad, el cáncer, enfermedades hematológicas, dermatológicas, alérgicas, infecciosas e inflamatorias, entre otras. La citometría de flujo permite la cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos con una elevada sensibilidad y especificidad, y con su empleo se han descrito nuevas subpoblaciones y sus funciones. **Objetivo:** Diseñar y optimizar un tubo policromático de citometría de flujo para inmunofenotipo linfocitario periférico. **Método:** Se realizó un estudio experimental in vitro con muestras de sangre periférica. Se seleccionaron seis antígenos: CD45, CD19, CD3, CD4, CD8 y CD56 para diferenciar linfocitos B, T, *Natural Killer (NK)* y *Natural Killer T (NKT)*. Se desarrolló un protocolo de lisis de hematíes sin lavado. Se realizó una curva de titulación a partir de la concentración recomendada por el fabricante de los anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (MACS MiltenyiBiotec), y se obtuvieron 5 diluciones seriadas. Se determinó el punto óptimo de concentración, correspondiente con mayor índice de tinción, menor señal de fondo y conservación de los porcentajes de positividad de cada población. Con las concentraciones óptimas de cada monoclonal se diseñó un tubo policromático para la detección de los 6 antígenos seleccionados.

Resultados: Los marcadores seleccionados permitieron realizar correctamente el inmunofenotipo linfocitario periférico de linfocitos B, T, T CD4+, T CD8+, T doble positivos, T doble negativos, NK y NKT. En los cinco puntos de titulación se observaron buenas discriminaciones entre las señales positivas y negativas, excepto para el anti-CD56 que presentó una tendencia decreciente del índice de

tinción. El volumen total de conjugados requeridos para la determinación de los 6 antígenos fue de 3.75 μ L por tubo.

Conclusiones: Se obtuvo un tubo policromático que permite el inmunofenotipo periférico de forma rápida y precisa por 6 antígenos linfocitarios simultáneamente, con el empleo de pequeños volúmenes de conjugado y sangre.

Aporte social y económico:

La utilización de un protocolo de tinción de lisis de hematíes sin lavado, un solo tubo policromático y el empleo de un coctel de conjugados para dispensarlos en solo paso, hace más sencilla la operatoria y disminuye el tiempo de desarrollo de la técnica. Esto condujo a una notable reducción de errores de procedimientos y reducción del tiempo de trabajo, dando la posibilidad de procesar mayor número de muestras con mucha confiabilidad, robustez y reproducibilidad. La optimización de las concentraciones de monoclonal necesarias para obtener resultados permitió reducir considerablemente las cantidades necesarias por muestra lo que produce una reducción de los costos pues son reactivos con precios elevados, a la vez que permite analizar un mayor número de muestras. Contar con este protocolo que permite la cuantificación de diferentes subpoblaciones linfocitarias periféricas constituye de gran relevancia para el diagnóstico de inmunodeficiencias, así como el estudio de enfermedades autoinmunes, inflamatorias, infecciosas, incluyendo la evaluación de pacientes afectados por la infección por el nuevo virus SARS-CoV-2.