

# Interferencia por autofluorescencia en soluciones de lavado para Citometría de Flujo

Estefanía Morales Herrera, Mireia González Lérída, Carlos Lázaro Perona, Judith Vidal Martínez  
Citometría de Flujo. Catlab, Hospital Universitario Mútua de Terrassa

## INTRODUCCIÓN

La Albúmina de Suero Bovino (más conocida en inglés como BSA), es una solución amortiguadora e isotónica cuya función es mantener el pH y la presión osmótica celular lo más similar al ambiente fisiológico natural. En nuestra rutina clínica, se detecta una interferencia por autofluorescencia en el canal de V450 (láser violeta) en los citómetros FACSCanto II y FACSLyric, en aquellas muestras preparadas con BSA 0.5% como solución de lavado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realiza un estudio comparativo de señales para el canal V450 entre la solución de lavado de BSA 0.5% y la solución BSA 0.2%, esta última utilizada como solución de lavado en protocolos de enfermedad mínima residual por Citometría de Flujo. El estudio se realizó bajo las siguientes condiciones:

- Se elige el anticuerpo CD20-V450 como representante de todos los anticuerpos conjugados con el fluorocromo V450.
- Los BSA son preparados al mismo tiempo y conservados en las mismas condiciones en cámara frigorífica (4°C).
- Se selecciona la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MFI) para la población de Linfocitos B CD20+ como valor de Señal y la MFI del resto de la población linfocitaria CD45+ como valor de Ruido (señal de "background" inespecífica).
- El estudio se realiza durante 16 días (no consecutivos por ser días no laborables). Por la frecuencia de su uso en la rutina diaria, estimamos que los preparados de solución de lavado de BSA son consumidos en un periodo máximo de 14 días.
- La comparación de la ratio Señal/Ruido se realiza mediante un panel de dos anticuerpos (CD20-V450/CD45-V500) en dos muestras diarias de sangre total en EDTA (seleccionadas al azar), duplicando el montaje con las diferentes soluciones de lavado (BSA 0.2% y BSA 0.5%).
- Las muestras se procesan por un citómetro digital FACSLyric (BD Biosciences). Las soluciones de BSA se preparan con PBS y albúmina a concentraciones 0.2% y 0.5% a pH fisiológico.

## OBJETIVOS

- Minimizar la interferencia de señal por autofluorescencia observada en el canal V450.
- Realizar una comparación de las interferencias por autofluorescencia para las soluciones de lavado BSA 0.5% y BSA 0.2% mediante la ratio Señal/Ruido para el canal de V450.
- Monitorizar la evolución de las interferencias en función del tiempo transcurrido desde el preparado de las soluciones de lavado.

## RESULTADOS

DÍA	1		2		3		4		5		8	
BSA	0.5%	0.2%	0.5%	0.2%	0.5%	0.2%	0.5%	0.2%	0.5%	0.2%	0.5%	0.2%
MEDIA RATIO S/R MUESTRAS	144.28	185.81	83.57	122.00	64.66	205.51	35.32	202.28	36.89	284.19	23.7	307.37

DÍA	9		10		11		15		16			
BSA	0.5%	0.2%	0.5%	0.2%	0.5%	0.2%	0.5%	0.2%	0.5%	0.2%		
MEDIA RATIO S/R MUESTRAS	24.84	221.44	27.13	238.97	25.71	236.20	25.91	208.34	19.08	259.79		

Tabla 1. Media de los ratios Señal/Ruido diaria obtenida con cada solución de lavado.

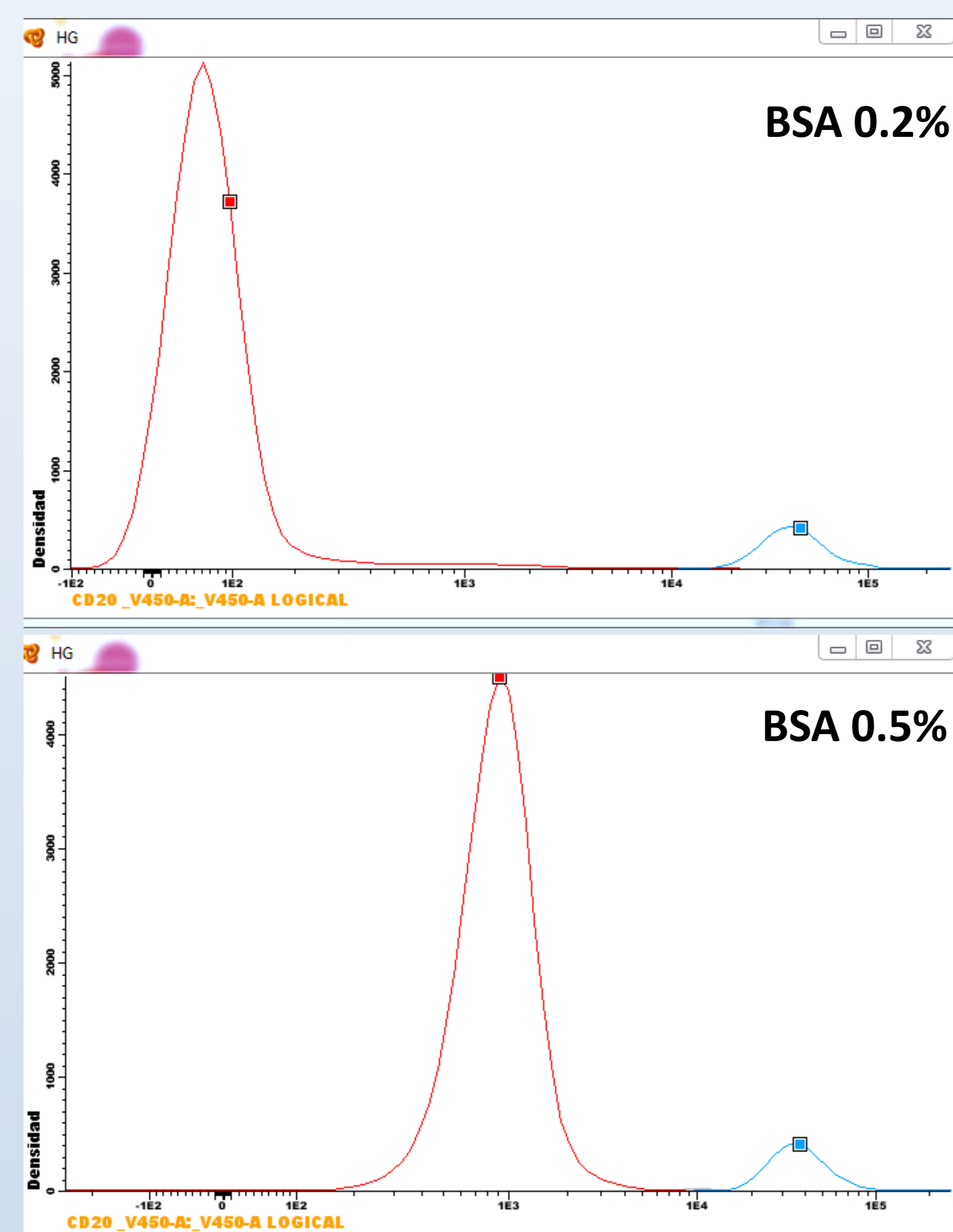


Figura 1. En rojo, población CD45+CD20-. En azul, población CD45+CD20+.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados (Tabla 1) muestran diferencias significativas a partir del tercer día desde la elaboración de las soluciones de lavado, cuando el preparado de BSA 0.5% empieza a mostrar ratios Señal/Ruido significativamente inferiores a los preparados con BSA 0.2%, indicando una mayor autofluorescencia de la solución de BSA 0.5%. Se concluye que los preparados con BSA 0.2% se mantienen estables durante los 16 días de análisis, con variaciones de los ratios Señal/Ruido que no muestran tendencias significativas y que pueden estar asociados a interferencias por la matriz de las propias muestras. La conclusión final del estudio es que el BSA 0.2%, conservado en cámara frigorífica a 4°C, se mantiene más estable que el BSA 0.5% y proporciona mejores ratios Señal/Ruido durante más tiempo, sin perjuicio observado para las muestras y/o los estudios inmunofenotípicos que realizamos en nuestra asistencia.

Finalmente, se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva sobre el BSA y sus productos de degradación, sin obtener resultados concluyentes. Probablemente la interferencia del BSA 0.5% pueda ser debida a una degradación acelerada cuyo producto autofluorescente emita en una longitud de onda similar a la captada por el detector de V450 o bien ser la consecuencia de productos de precipitación del mismo.

