

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE
SALUD DEL NIÑO-SAN BORJA

“Año del Dialogo y la Reconciliación Nacional”



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Lima, 14 MAR. 2018

VISTO:

El Expediente N° 18-001213-001/INSNSB sobre la aprobación del Manual de procedimientos técnicos de Patología Clínica-Hematología Especializada de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento; y,

CONSIDERANDO:

Que, los Artículos I y II del Título Preliminar de la Ley N° 26842, Ley General de Salud, establecen que la salud es condición indispensable del desarrollo humano y medio fundamental para alcanzar el bienestar individual y colectivo, por lo que la protección de la salud es de interés público, siendo responsabilidad del Estado regularla, vigilarla y promoverla;

Que, el Segundo párrafo del Artículo 5° del Decreto Supremo N° 013-2006-SA, Reglamento de Establecimientos de Salud y Médicos de Apoyo, establece que los establecimientos de salud y servicios médicos de apoyo deben contar, en cada área, unidad o servicio, con manuales de procedimientos, guías de práctica clínica referidos a la atención de los pacientes, personal, suministros, mantenimiento, seguridad, y otros que sean necesarios, según sea el caso;

Que, el inciso s) del Artículo 37° del Decreto Supremo N° 013-2006-SA, Reglamento de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo, establece que al Director Médico le corresponde disponer la elaboración del Reglamento interno, de las guías de práctica clínica y de los manuales de procedimientos referidos a la atención de los pacientes, personal, suministros, mantenimiento, seguridad, y otros que sean necesarios;

Que, mediante la Resolución Ministerial N° 302-2015/MINSA fue aprobada la Norma Técnica N° 117/DGSP-V.01 “Norma Técnica para la Elaboración y Uso de Guías de Práctica Clínica del Ministerio de Salud”, la cual establece el marco normativo para la elaboración de las Guías de Práctica Clínica en el Sector Salud;



Que, conforme al inciso k) del numeral II.4.2. del Manual de Operaciones del Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja, aprobado mediante Resolución Ministerial N° 512-2014/MINSA, establece que es función de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento el elaborar y proponer en coordinación con la Unidad de Desarrollo de Investigación, Tecnologías y Docencia, normas, guías técnicas, en el campo de las especialidades del instituto, así como efectuar su aplicación, monitoreo y evaluación;

Que, mediante el Anexo 3 de la Ficha de Descripción de Procedimiento: "Elaboración. Aprobación y Cumplimiento de Adherencia de las Guías de Práctica Clínica y/o Guía de Procedimiento", del Manual de Procesos y Procedimientos de la Unidad de Gestión de la calidad, aprobado por Resolución Directoral N° 155/2015/INSN-SB/T, se establece la estructura de la Guía de Procedimiento;

Que, mediante la Nota Informativa N° 005-2018-PC/INSN-SAN BORJA, de fecha 18 de enero de 2018, la Dra. Carla Elizabeth Méndez Chacón Rodríguez, Médico Patólogo Clínico del Instituto Nacional de Salud del Niño- San Borja, remitió al Director Ejecutivo de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento, el Manual de Procedimientos Técnicos de Patología Clínica- Hematología Especializada de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento;

Que, mediante la Nota Informativa N° 0070-2018-UGC-INSN-SB, de fecha 25 de enero de 2018, la Jefa de la Unidad de Gestión de la Calidad remite el Manual de Procedimientos Técnicos de Patología Clínica- Hematología Especializada, el cual cuenta con la opinión favorable de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento, de la Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico y de la Unidad de Gestión de la Calidad;

Que, mediante el Memorando N° 077-2018-DG/INSNSB, de fecha 29 de enero de 2018, la Directora General del Instituto Nacional de Salud del Niño- San Borja solicita disponer la elaboración de la Resolución Directoral del Manual de Procedimientos Técnicos de Patología Clínica- Hematología Especializada de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento;

Con el visto bueno del Director Adjunto, del Director Ejecutivo de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento, de la Jefa de Oficina de la Unidad de Gestión de la Calidad; y, de la Jefa de Oficina de la Unidad de Asesoría Jurídica;

Por estas consideraciones, y de conformidad con la Ley N° 26842, Ley General de Salud, con el Decreto Supremo N° 013-2006-SA, Reglamento de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo, con la Resolución Ministerial N° 302-2015/MINSA; con la Resolución Ministerial N° 090-2013/MINSA, con la Resolución Ministerial N° 512-2014/MINSA; y, con la Resolución Jefatural N° 340-2015/IGSS;



SE RESUELVE:

ARTÍCULO 1°.- APROBAR el Manual de Procedimientos Técnicos de Patología Clínica-Hematología Especializada de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento.

ARTÍCULO 2°.- ENCÁRGUESE a la Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico, la implementación del Manual de Procedimientos Técnicos de Patología Clínica-Hematología Especializada de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento, aprobado con la presente resolución.

ARTÍCULO 3° ENCÁRGUESE a la Unidad de Gestión de la Calidad, la evaluación del cumplimiento del presente Manual.

ARTÍCULO 4°.- DISPONER que se realice la publicación de la presente Resolución en la Página Web de la Institución, conforme a las normas de Transparencia y Acceso a la Información Pública.

REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y PUBLÍQUESE



insn Instituto Nacional de Salud del Niño
San Borja
[Signature]
Dra. Zulema Tómas Gonzáles
DIRECTORA GENERAL

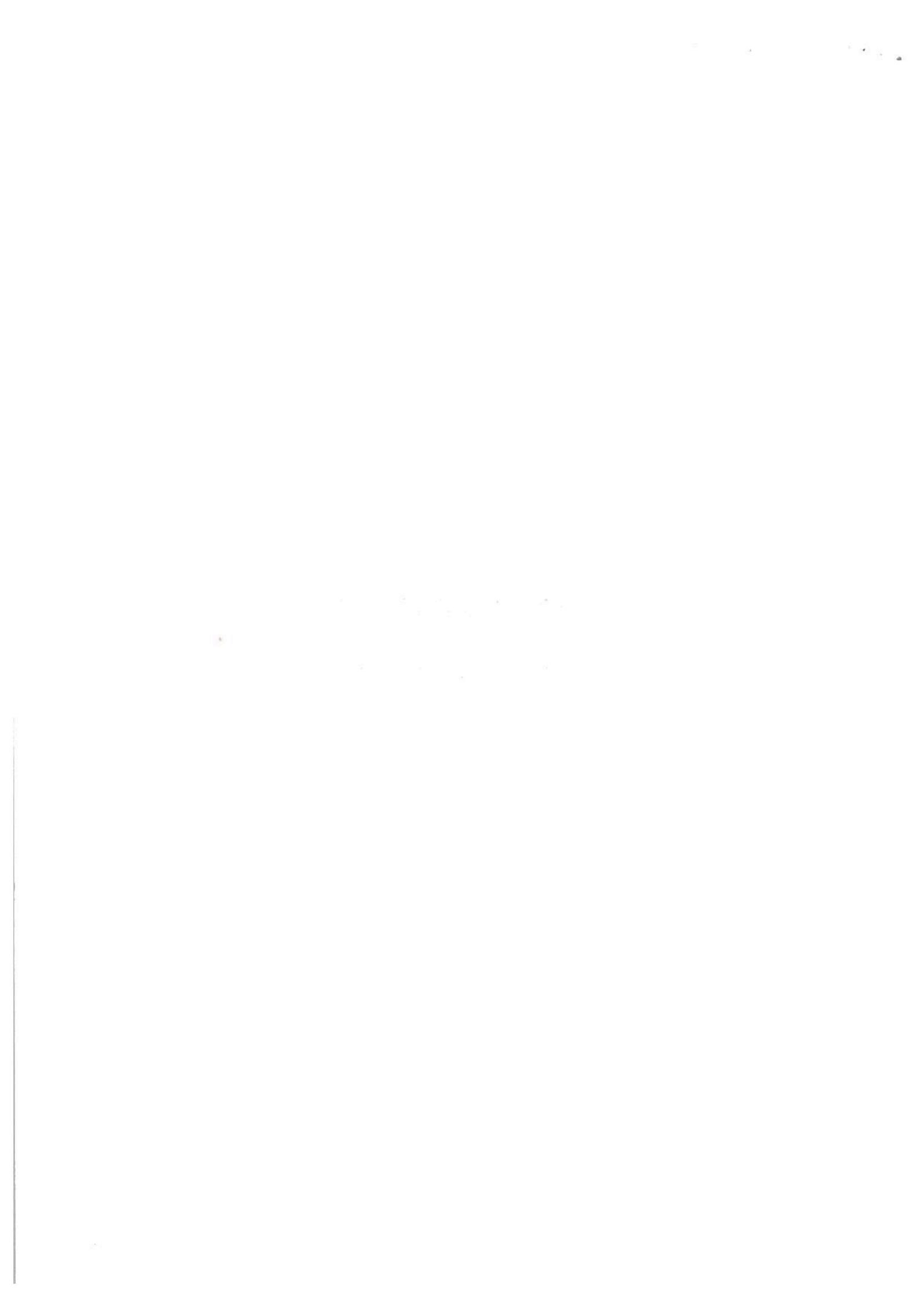


EZTG/BSPB/dpm

Distribución

- () Dirección Adjunta
- () Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento
- () Unidad de Asesoría Jurídica
- () Unidad de Gestión de la Calidad
- () Unidad de Tecnologías de la Información
- () Archivo







PERÚ

Ministerio de Salud

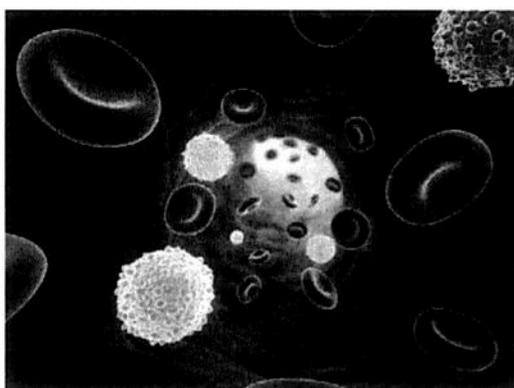
Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TECNICOS DE PATOLOGICA CLINICA-HEMATOLOGIA ESPECIALIZADA

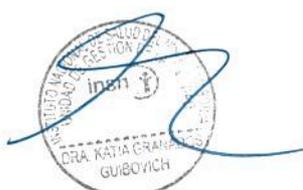
UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO

SERVICIO DE PATOLOGIA CLINICA



<p>Elaborado por:</p> <p>Equipo Técnico de Patología Clínica</p>	<p>Revisado por:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento • Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico • Unidad de Gestión de la Calidad 	<p>Aprobado por:</p> <p>Dra. Zulema Tomás González Directora de Instituto Especializada del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja</p>
---	---	--

Fecha : Enero 2018	Código : M-009/INSN-SB/USDXT-PC-V.01	Página : 1 de 60
--------------------	--------------------------------------	------------------

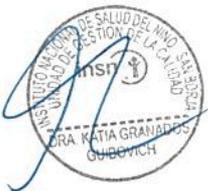




Manual de Procedimientos Técnicos de Patología Clínica - Hematología Especializada

ÍNDICE

- I. Procedimiento de Determinación Cuantitativa de Linfocitos T CD3+.....3
- II. Procedimiento de Enumeración de Células Progenitoras Hematopoyéticas CD34+ por Citometría de Flujo de 8 colores.....13
- III. Procedimiento de Estudio de Enfermedad Mínima Residual de Leucemias Agudas por Citometría de Flujo de 8 colores.....21
- IV. Procedimiento de Estudio de Leucemia Aguda por Citometría de Flujo de 8 colores.....31
- V. Procedimiento de Estudio de Líquido Cefalorraquídeo por Citometría de Flujo.....42
- VI. Procedimiento de Recuento de Linfocitos T CD4/CD8 por Citometría de Flujo.....51





I. Procedimiento de Determinación Cuantitativa de Linfocitos T CD3

1. Título

Procedimiento de Determinación Cuantitativa de Linfocitos T CD3+

2. Código

CPT: 88205

3. Objetivo

La determinación cuantitativa de linfocitos T está basada en la detección de marcadores de membrana CD3 y otros presentes en la superficie celular del linfocito T, su recuento permite conocer el estado del sistema inmune del paciente en ciertas patologías o el grado de disfunción inmunológica en casos post trasplantes.

La importancia de efectuar la cuantificación de linfocitos T CD3+ previo al trasplante radica en que estas células junto con las NK y células CD34+ del donante están involucradas en la toma del injerto y dependiendo de la enfermedad los linfocitos T del donante son capaces de re inducir remisiones en pacientes con recaídas luego del trasplante alogénico.

4. Indicaciones

INDICACIONES ABSOLUTAS.- Determinación de linfocitos T CD3+ en producto de colecta de progenitores hematopoyéticos

INDICACIONES RELATIVAS.- Valoración de éxito de injerto en trasplante de progenitores hematopoyéticos.

5. Contraindicaciones

Ninguna.

Fecha : Enero 2018	Código : M-009/INSN-SB/USDXT-PC-V.01	Página : 3 de 60
--------------------	--------------------------------------	------------------





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



6. Responsables

- Médico Patólogo Clínico.
- Tecnólogo Médico.
- Biólogo.
- Técnico de Laboratorio.

7. Materiales e Insumos

7.1 Equipos Biomédicos

- Citómetro de Flujo FACS Calibur de cuatro colores: FITC, PE, Per CP y APC.
- Homogenizador ó agitador de tubos.
- Refrigeradora/ conservadora para reactivos
- Cronómetro de 4 tiempos.

7.2 Material médico no Fungible

- Tips Eppendorf descartables de 50 – 1,000 ul.
- Tips Eppendorf descartables de 2 20ul
- Tubos de poliestireno FALCON 12 x 75mm, capacidad 5ml con tapa.
- Tubos Trucount.
- Pipeta de transferencia estéril FALCON de 3ml, con empaque individual
- Gradillas ad hoc para el material solicitado.
- Micropipetas de volumen variable para dispensar 20 µL, 50 µL, 450 µL

7.3 Material médico Fungible

Reactivos

- Kit Calibrite 3 (perlas de calibración del citómetro) x 25 determinaciones.
- Kit Calibrite APC (perlas de calibración de esa fluorescencia) x 25 determinaciones.
- Kit CD3+CD56+CD45+CD19+ x 50 determinaciones
 - CD3 FITC Clona SK7
 - CD16 PE Clona B73.1
 - CD56 PE Clona NCAM 16,2

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-SB/USDXT-PC-V.01

Página : 4 de 60





PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San
Borja



- CD45 PER CP Clona 2D1
- CD19 APC Clona SJ25C1

Materiales

- Guantes descartables para procedimiento
- Gafas protectoras.

Soluciones

- Solución salina x 20 L para el Citómetro de Flujo
- Solución Facs Lysing 100X
- Solución Hipoclorito de sodio diluido 1:10
- Agua destilada estéril

8. Procedimiento

Tiempo: 40 minutos

8.1 Preparación de Muestra

Pasos:

1. Rotular 2 tubos Trucount con el nombre del paciente/donante.
2. Homogenizar los tubos conteniendo las muestras y dispensar 50ul de muestra para cada tubo.
3. Adicionar a los tubos 20 ul del coctel de anticuerpos CD3/CD56/CD45/CD19.
Efectuar el pipeteo en reversa.
4. Homogenizar e incubar a temperatura ambiente y en oscuridad por 15 minutos.
5. Adicionar a cada tubo 450ul de solución Facs Lysing (diluido 1:10 con agua destilada estéril).
6. Homogenizar e incubar a temperatura ambiente y en oscuridad por 15 minutos.
7. Colocar los tubos en baño maría helado y se procede a su adquisición en el citómetro.

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-
SB/USDXT-PC-V.01

Página : 5 de 56





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



8.2 Adquisición en el Clitómetro

Pasos:

1. Aperturar la plantilla del Software BD MultiTest en el citómetro de flujo
2. Seleccionar la fuente de datos "From Cytometer Acquisition with Analysis"
3. De manera automática el programa da la opción de calibrar o obviar este paso, en caso de obviar abrir los cytometer settings y seleccionar la calibración optimizada MULTITEST.opt.
4. Ajustar el threshold FL3 a 300 para excluir todo el debris posible.
5. Ingresar las preferencias de análisis.
6. Ingresar los datos de la muestra, tipo, panel a elegir
7. Proceder a adquirir la muestra, la adquisición se detendrá cuando alcance el número de eventos configurado.

8.3 Análisis de la Muestra

Pasos:

1. El software es amigable, práctico y sofisticado, el analista verificará que las regiones delimitadas correspondan realmente a las poblaciones celulares que se quiere delimitar. Sobre todo la población linfoide. ANEXO 1.
2. La población linfoide es identificada por expresar CD45 brillante, los linfocitos B son menos brillantes en relación a los linfocitos T, en tanto los NK son de intensidad similar a los linfocitos T Pero con una señal ligeramente alta en SSC.
3. El conteo absoluto de la población celular puede ser calculado usando la siguiente ecuación:

- $A = X / Y \times N / V$

X es el número de eventos de células positivas.

Y es el número de los eventos de las perlas.

N es el número de las perlas por test, el cual se encuentra en el empaque varía de lote a lote.

V es el volumen de la muestra





4. Los datos obtenidos para informar son los siguientes:

- Porcentaje de Linfocitos.
- Conteo absoluto de CD3.
- Conteo Absoluto de CD45.

8.4 Reporte de Datos

Pasos:

1. Del análisis realizado el programa realiza los cálculos para la población linfoide T elaborando el Lab Report, el mismo que debe imprimirse por duplicado. ANEXO 2.
2. Los datos son transcritos en la plantilla de resultado por triplicado: Centro de Hemoterapia y Banco de Sangre, Sub Unidad de TPH y archivo de laboratorio. ANEXO 3.
3. El resultado firmado por el médico responsable se entregarán al área de Hemoterapia y Banco de Sangre y sub Unidad de TPH con firma de cargo.
4. Los resultados se archivan tanto en físico como digital.
5. La orden del paciente se entregará a secretaría de la sub unidad de Patología Clínica para su registro, quien remite al técnico para su ingreso y registro y demás trámites contables (SIS).

8.5 Interpretación de datos e Intervalos de Referencia

Pasos:

1. Se recomienda que la interpretación de los datos debería realizarse usando un intervalo referencial establecido por otro laboratorio.
2. Los intervalos de referencia en la medida de lo posible debería ser determinado por cada laboratorio.
3. El funcionamiento del reactivo fue analizado por el fabricante, efectuándose ensayos del reactivo con otro denominado Tritest, y asimismo se efectuó estudio comparativo entre el citómetro FACS Calibur y FACS Canto en tres centros de investigación clínica en Estados Unidos, la población evaluada fueron personas sanas cuyas edades oscilaban de 18 a 64 años.

Fecha : Enero 2018	Código : M-009/INSN-SB/USDXT-PC-V.01	Página : 7 de 56
--------------------	--------------------------------------	------------------





8.6 Entrega de Resultados

Pasos:

1. Los resultados del recuento de células progenitoras CD3+ son emitidos inmediatamente de haberse concluido el análisis y entregados a las áreas correspondientes con registro de cargo.

8.7 Archivo de Resultados

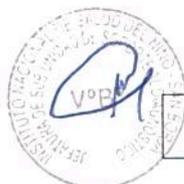
Pasos:

1. La data virtual del citómetro será almacenada en unidades de almacenamiento de manera mensual y anual.
2. El registro físico del resultado será archivado por el personal del área.

9. Complicaciones

Ninguna.

10. Anexos





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja



ANEXO 1

REPORTE DE ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

BDB

MultiSET™ Lab Report

Director: L. Rockdale
Operator: MG/LL

Software: MultiSET V2.0
Cytometer: FACSCalibur

Sample Name: SAMPLE 4
Sample ID:
Case Number:
Panel Name: 4 Color TBNK

Date Acquired: Fri, Feb 1, 2002 2:48 PM
Date Analyzed: Fri, Feb 1, 2002
Ref. Range Type: BD

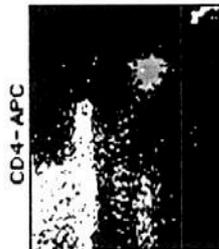
CD3/CD8/CD45/CD4

Data Set [1] Data File: SAMPLE 404.01

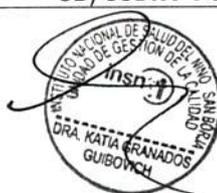
Reagent Lot ID: 00000 Events Acquired: 15000

Attr Def File: 3/8/45/4.MLT v2.0

Lymph Events	2495
CD3+ %Lymph	57
CD3+CD8+ %Lymph	13
CD3+CD4+ %Lymph	44
CD3+CD4+CD8+ %Lymph	0
TH/S Ratio	3.46



expert lymph gate





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja



ANEXO 2

REPORTE DE CUANTIFICACION DE LINFOCITOS T POR CITOMETRÍA DE FLUJO

BDB
MultiSET™ Physician Report

Director: OSX
Operator: MG

Software: MultiSET Y2.0
Cytometer: FACSCalibur

Sample Name: MGOSX01FCD3
Sample ID:
Case Number:
Panel Name: 3 Color TBNK + TruC

Date Acquired: Wed, Apr 3, 2002 1:36 PM
Date Analyzed: Wed, Apr 3, 2002
Reference Range Type: BD

Table with 4 columns: Result Name, %/Ratio, Abs Cnt (cells/μL), Reference Range. Rows include T Lymphs, T Helper, T Suppressor, B Lymphs, and NK Lymphs.

*For quality control purposes only

Multi-tube QC

Lymphosum: 125.9
CD3 % Lymph Difference: 2
CD3 Abs Cnt Range: 610 - 729
T Helper/Suppressor Ratio: 0.32

Comments:

Verbal Order

Laboratory Director:





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja

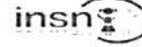


ANEXO 3

INFORME DE RESULTADO LINFOCITOS T



Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja



SERVICIO DE PATOLOGIA CLINICA INMUNOBIOQUÍMICA ESPECIALIZADA – CITOMETRÍA DE FLUJO

INFORME DE ESTUDIO DE LINFOCITOS T CD3+

NOMBRE DONANTE:	HISTORIA CLÍNICA:
NOMBRE RECEPTOR:	HISTORIA CLÍNICA:
TIPO DE MUESTRA (remitida): Aféresis	EDAD: años
SERVICIO: TPH	
DIAGNÓSTICO: Donante Sano	
MÉDICO SOLICITANTE: Dr.	
FECHA RECEPCIÓN MUESTRA:	HORA RECEPCION MUESTRA: 07:40:00
FECHA INFORME:	

RESULTADO

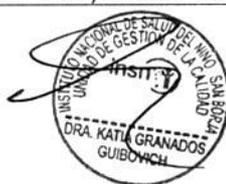
LINF T CD3+ CF 00 -16

ENUMERACION DE LINFOCITOS T POR CITOMETRÍA DE FLUJO

LINFOCITOS T CD3+/CD45+:	%
LINFOCITOS T CD3+ Conteo Absoluto:	<u>Cél/ul</u>
LINFOCITOS CD45+ Conteo Absoluto:	<u>Cél /ul</u>

METODOLOGIA: CF/MULTITEST

CMS/BChC
Blga RRM





11. Bibliografía

1. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline- Second Edition. Gratama J.,Keeney M., Mandy F., Sutherland R.CLSI. 2007. H-42-A2 Vol 27 N°16.
2. Immunophenotypic enumeration of CD4+ T-lymphocyte values in human immunodeficiency virus- seronegative adults in Eastern India. Dash M., Padhi S., Panda P., Parida B., Patra GC. International Journal of Medicine and Biomedical Research. Vol 1 Issue 3. Sep- Dic 2012.
3. Laboratory Guidelines for enumerating CD4 T Lymphocytes in the context of HIV/AIDS. World Health Organization Mew Delhi June 2007.
4. Adoption of Single -Platform Technologies for Enumeration of Absolute T-Lymphocyte Subsets en Peripheral Blood.Maurice R.G.O’Gorman Janet K.A. Nicholson. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, May 2000, p. 333-335.
5. T and B lymphocyte enumeration in pediatric lymphoreticular neoplasms and application of the cytocentrifuge to the enumeration of T lymphocytes. Lorraine K. Ishizu. Oregon Health & Science University June 1979.
6. Guidelines for the enumeration of CD4+ T lymphocytes in immunosuppressed individuals. D.Barnett, G. Bird,E. Hodges.D.C.Linch, E Matutes AC. Newland J.T. Reilly. Lin Lab. Haem. 1997, 19, 231-241.
7. Factors affecting CD3+CD4+ Enumeration – The UK NEQAS Experience. International Clinical Cytometry Society Vol III N°1 Winter 2012.
8. Determination of Lymphocyte populations: The frog becomes a prince. International Clinical Cytometry Society Vol III N°1 Winter 2012.
9. Laboratory Procedure Manual. Lee Lam, Maejorie Hubbard. National Center of HIV and TB Prevention. 2004.Enumeration of Lymphocytes subsets (Immunophenotyping-IGT) (CD3,CD4,CD8,CD19 & CD16/CD56) Universiti Sains Malaysia. 2014
10. Quantifyng T lymphocyte turnover. Rob J. De Boer, Alan S. Perelson. Journal of Theoretical Biology. (2013).





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



II. Procedimiento de Enumeración de Células Progenitoras Hematopoyéticas CD34+ por Citometría de Flujo de 8 Colores

1. Título

Procedimiento de Enumeración de Células Progenitoras Hematopoyéticas CD34+ por Citometría de Flujo de 8 colores.

2. Código

CPT: 8818701

3. Objetivo

Este procedimiento permite identificar y cuantificar a las células madre hematopoyéticas por la expresión del marcador CD34. Las células madres y hematopoyéticas son células indiferenciadas con una amplia capacidad de proliferación y de autorrenovación; están presentes en médula ósea (1%-3%) y en sangre (0,1%) y pueden ser movilizadas desde la médula ósea a la sangre periférica después de quimioterapia o con citoquinas.

La decisión para el uso de TCH está determinada por la enfermedad que afecta al paciente y sus condiciones generales así como la disponibilidad del donante.

Los centros de trasplante dependen totalmente de la cuantificación de este marcador por Citometría de flujo para determinar el momento óptimo de la colecta y confirmar que la movilización es la adecuada.

4. Indicaciones

INDICACIONES ABSOLUTAS.- Normalizar el proceso a realizarse para enumeración de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ por Citometría de flujo en sangre periférica, panel basado en método ISHAGE.

INDICACIONES RELATIVAS.- Normalizar el proceso a realizarse para enumeración de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ por Citometría de flujo en producto de aféresis.

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-SB/USDXT-PC-V.01

Página : 13 de 60





5. Contraindicaciones

Ninguna.

6. Responsables

- Médico Patólogo Clínico.
- Tecnólogo Médico.
- Biólogo.
- Técnico de Laboratorio.

7. Materiales e Insumos

7.1 Equipos Biomédicos

- Citómetro de Flujo FACS Canto II de 8 colores: V450, V500, FITC, PE, PerCP Cy5.5, PE Cy7, APC y APC-H7.
- Homogenizador o agitador de tubos.
- Refrigeradora/ conservadora para reactivos
- Cronómetro de 4 tiempos.
- Centrífuga de mesa con buckets para tubos de diferente tamaño.

7.2 Material médico no Fungible

- Tubo plástico 3 mL al vacío con EDTA K2Gradillas para los tubos solicitados
- Micropipeta de volumen variable 100 μ L - 1000 μ L
- Micropipeta de volumen variable 10 μ L - 200 μ L
- Micropipeta de volumen variable 0.5 μ L - 10 μ L
- Punteras descartables de 100 μ L – 1000 μ L
- Punteras descartables de 10 μ L – 200 μ L
- Punteras descartables de 0.5 μ L – 10 μ L
- Tubo de polipropileno, fondo cónico graduado x 15 mL





PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San
Borja



7.3 Material médico Fungible

Reactivos

- Perla calibradora de citómetro de flujo de 8 colores
- Perla calibradora para células progenitoras
- Tubos con perlas de referencia (TruCount)
- Anticuerpos CD45 FITC/CD34 PE
- 7-AAD
- Solución lisante de cloruro de amonio
- Controles CD34 Low/Hi

Materiales

- Guantes descartables para procedimiento
- Gafas protectoras.

Soluciones

- Solución buffer para citometría de flujo
- Solución shut down para el citómetro de flujo
- Solución de limpieza para el citómetro de flujo

8. Procedimiento

TIEMPO: 120 minutos

8.1 Recepción de Muestra

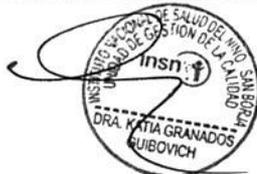
Pasos:

1. Revisar que la muestra no presente coágulos, que el tubo se encuentre rotulado.
2. La orden debe indicar los datos completos del paciente como nombre, historia clínica, edad, diagnóstico, solicitud de estudio, datos clínicos, último examen hematológico, y demás.
3. Anotar datos del paciente en el cuaderno de registro, designándole el código interno de citometría de flujo (CF).

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-
SB/USDXT-PC-V.01

Página : 15 de 56





8.2 Preparación de la Muestra

Pasos:

1. Rotular con el código interno (CF) dos tubos TruCount, uno para la muestra y el otro para un control CD34 Low o Hi.
2. Por pipeteo inverso agregar 100 µL de sangre o control.
3. Agregar a ambos tubos 20 µL del coctel de anticuerpos CD45 FITC/CD34 PE.
4. Vórtex e incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
5. Adicionar 2 mL de solución lisante de cloruro de amonio para destruir la serie roja.
6. Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
7. Luego, en una gradilla colocar los dos tubos en un recipiente con packs de hielo
8. La muestra puede permanecer a 4 °C en oscuridad por 1 hora hasta la lectura o adquisición.

8.3 Adquisición en el Clitómetro

Pasos:

1. Aperturar el área de trabajo de Diva (Workspace) en donde se tiene:
 - a. Browser: ventana donde se organizan las carpetas, subcarpetas y archivos de cada usuario.
 - b. Instrument Cytometer: panel de los controles del citómetro, parámetros, compensaciones, threshold.
 - c. Acquisition Dashboard: panel de adquisición (comenzar adquisición, salvar eventos, regiones)
 - d. Inspector: Información detallada sobre la ventana o plot que se encuentre seleccionado.
 - e. Global worksheet: plantilla de trabajo que contiene los plots, estadísticas, información sobre el experimento y anotaciones del usuario.
2. Realizados los pasos para poner en marcha el citómetro (hacer 1º un “fluidics startup”, duración 7 minutos, 2º cleaning modes y conectar el citómetro).
3. Proceder con el protocolo de lavado diario del equipo, usando solución conrad y agua destilada.





4. Una vez terminado el lavado cerrar el programa FACSDiva y abrir el programa FACSCanto Clinical módulo 7 set up para pasar un tubo del kit de perla calibradora para células progenitoras. Correr la prueba y dejar que el programa realice el setup automáticamente.
5. Una vez terminada la calibración, el mismo programa FACSCanto Clinical seleccionar el módulo Stem Cell Enumeration. Ingresar el código del paciente y del control.
6. Vórtex de la muestra antes de colocarlo en la aguja de adquisición.
7. Seleccionar "RUN", el programa detendrá la adquisición automáticamente.

8.4 Análisis de Datos

Pasos:

1. Analizar los datos adquiridos con el programa FACSCanto Clinical.
2. Los cálculos relativos y de recuentos absolutos se calculan automáticamente luego de ajustar las regiones que encierran a las poblaciones celulares y perlas de referencia.

8.5 Reporte de Datos

Pasos:

1. El resultado final con el nombre, otros datos del paciente, los gráficos analizados y la estadística se imprime desde el programa FACSCanto Clinical.
2. La orden del paciente se entregará a secretaría de la sub unidad de Patología Clínica para su registro, quien remite al personal técnico para su ingreso y registro así como demás trámites contables (SIS).

8.6 Entrega de Resultados

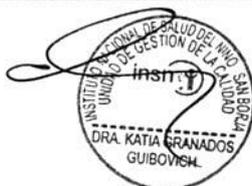
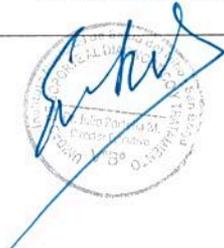
Pasos:

1. Los resultados serán entregados inmediatamente de haberse concluido el análisis.

8.7 Archivo de Resultados

Pasos:

1. La data virtual del citómetro será almacenada en unidades de almacenamiento de manera mensual y anual.
2. El registro físico del resultado será archivado por el personal del área.



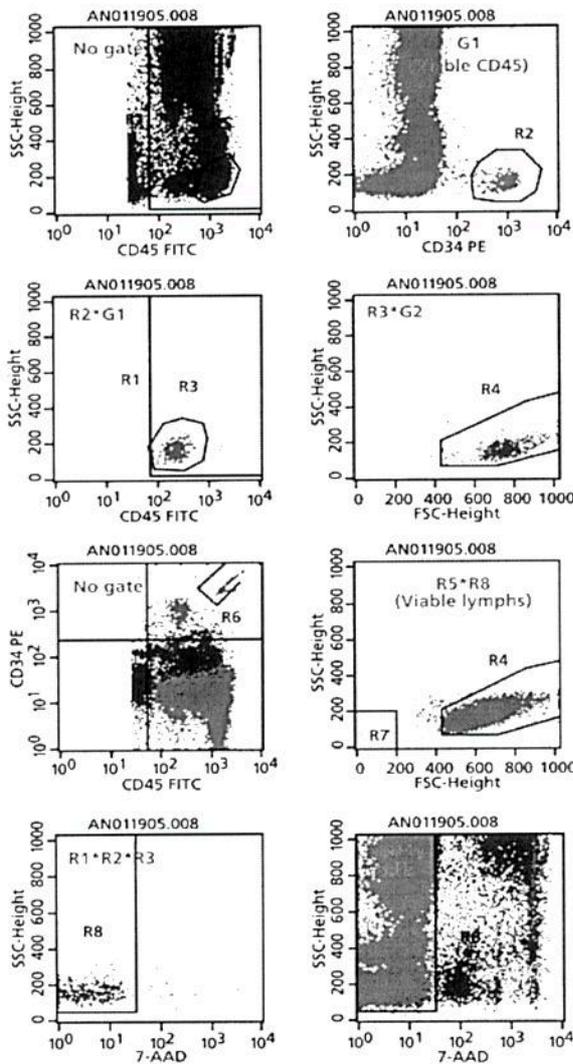


9. Complicaciones

Ninguna.

10. Anexos

ANEXO 1 REPORTE DE ANÁLISIS DE ENUMERACIÓN DE CPH CD34+ DE CITOMETRÍA DE FLUJO



Enter These Values

Trucount = 49955.00

Dilution Factor = 1.00

Sample Volume = 100.00

File: AN011905.008
 Sample ID: IQCB333E59011905R2
 Patient ID: CORD BLOOD
 TruCOUNT: 49955
 Dilution Factor: 1
 Custom Keyword #3:
 Acquisition Date: 19-Jan-09
 Total Events: 113660

Gate	Events	% Gated
Viable CD45	71418	79.54
G2	544	0.61
G3	541	0.60
Viable CD34	538	0.60
Beads	2913	3.24
Total CD34	549	0.61
Viable Lymphs	19251	21.44
TotalCD45	85079	94.75
Debris	0	0.00

Inspect All Dot Plots

Results

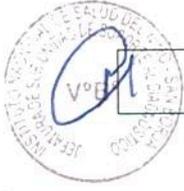
Viable CD34 = 92.26/μL

Viable CD45 = 12247.46/μL

Total CD34 = 94.15/μL

CD34 Viability = 98.00%

Viable CD34 of Viable CD45 = 0.75%





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



ANEXO 2

RESULTADO DE ENUMERACIÓN DE CPH CD34+ POR CITOMETRÍA DE FLUJO



Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja



SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA
INMUNOLOGÍA ESPECIALIZADA – CITOMETRÍA DE FLUJO

NOMBRE DONANTE:	HISTORIA CLÍNICA:
NOMBRE PACIENTE:	HISTORIA CLÍNICA:
TIPO DE MUESTRA (remitida):	EDAD:
SERVICIO: TPH	
DIAGNÓSTICO:	
MÉDICO SOLICITANTE:	
FECHA RECEPCIÓN MUESTRA:	HORA RECEPCIÓN MUESTRA: am

RESULTADO

CF- SCE 00 - 16

ENUMERACIÓN DE CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS POR
CITOMETRÍA DE FLUJO

Células CD34+ viables:		cél/ul
Células CD45 viables:	cél/ul	
Células CD34+ total:		cél/ul
Viabilidad CD34+:		%
Células CD34+/CD45+:	%	

METODOLOGÍA:
CF/PROTOCOLO ISHAGE

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-
SB/USDXT-PC-V.01

Página : 19 de 56



Handwritten signature





PERÚ

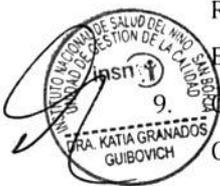
Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



11. Bibliografía

1. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. Barnett,D., Janossy G., Lubenko A., Matutes A.,Newland A., & Reilly J.T. Clin. Lab. Haem. 1999. 21, 301-308.
2. The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry. Robert Sutherland, Lori Anderson, Michael Keeney, Rakash Nayar, Ian Chin Yee. Journal of Hematotherapy 5:213-226 (1996).
3. A European Reference Protocol for Quality Assessment and Clinical Validation of autologous haematopoietic blood progenitor and stem cells grafts. S Serke, HE Johnsen. Bone Marrow trasplantation (2001) 27, 463 -470
4. Enumeration of CD34-positive Hematopoietic Progenitor Cells by Flow Cytometry : Comparison of a volumetric Assay and the ISHAGE Gating Strategy. S Leumer, M Arland, C Kahl, K Jentsch-Ullrich, A Franke, H-G Hoffkes. Blood Marrow Trasplantation (1998) 22, 699- 706.
5. Stem Cell Processing – Method and Graft Characterization - F. Lanza 2013-10-04
6. Standards For Hematopoietic Progenitor Cell Collection, Processing & Transplantation. From The Joint Accreditation Committee OF ISCT-Europe and EBMT Second Edition - Europe June 2003.
7. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods A. Gajkowska , T. Oldak, M. Jastrzevska , E.K. Machaj, J. Walewski , E. Kraszewska and Z. Pojda. Folia Histochemica Et. Cytobiologica Vol. 44, No. 1, 2006 Pp. 53-60.
8. Células Madre Hematopoyéticas, Generalidades Y Vías Implicadas En Sus Mecanismos De Auto-Renovación. Claudia Mera Reina, Angélica Roa Lara y Sandra Ramírez Clavijo. Rev. Cienc. Salud. Bogotá (Colombia) 5 (1): 67-89, abril-junio de 2007.
9. Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales. DraC. Consuelo Macías-Abraham; Lic. Lázaro O. del Valle-Pérez; Prof. Dr. C. Porfirio Hernández-Ramírez; Prof. Dr. C. José M. Ballester-Santovenia. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 2010; 26(4)256-275.
10. Células Madre Hematopoyéticas: origen, diferenciación y función. Marilú Domínguez Pantoja, Héctor Romero-Ramírez, Juan Carlos Rodríguez Alba. Rev. Med. UV, Enero - Junio 2015.





PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San
Borja



III. Procedimiento de Estudio de Enfermedad Mínima Residual de Leucemias Agudas por Citometría de Flujo de 8 Colores

1. Título

Procedimiento de Estudio de Enfermedad Mínima Residual de Leucemias Agudas por Citometría de Flujo de 8 colores.

2. Código

CPT: 88188

3. Objetivo

Detección de células inmaduras o blastos con fenotipo patológico de estirpes linfoide B, linfoide T o mieloide, luego de haber sometido al paciente a tratamiento.

4. Indicaciones

INDICACIONES ABSOLUTAS.- Estandarizar el proceso a realizarse para el estudio de enfermedad mínima residual de Leucemias Agudas de estirpe linfoide B

INDICACIONES RELATIVAS.- Realizar el estudio de enfermedad mínima residual de Leucemias agudas de estirpe T o mieloide.

5. Contraindicaciones

Ninguna.

6. Responsables

- Médico Patólogo Clínico.
- Tecnólogo Médico.
- Biólogo.
- Técnico de Laboratorio.

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-
SB/USDXT-PC-V.01

Página : 21 de 60





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



7. Materiales e Insumos

7.1 Equipos Biomédicos

- Citómetro de Flujo FACS Canto II de 8 colores: V450, V500, FITC, PE, PerCP Cy5.5, PE Cy7, APC y APC-H7
- Refrigeradora/ conservadora de 4 °C para reactivos.
- Agitador de tubos o vortex
- Reloj de tiempo con alarma
- Centrífuga de mesa con buckets para tubos de diferente tamaño.
- Bomba de succión aspiración

7.2 Material médico no Fungible

- Tubo plástico 3 mL al vacío con EDTA K2
- Gradillas para los tubos solicitados
- Micropipeta de volumen variable 100 µL - 1000 µL
- Micropipeta de volumen variable 10 µL - 200 µL
- Micropipeta de volumen variable 0.5 µL - 10 µL
- Punteras descartables de 100 µL – 1000 µL
- Punteras descartables de 10 µL – 200 µL
- Punteras descartables de 0.5 µL – 10 µL
- Tubos de poliestireno 12 x 75 mm de 5 mL, con tapa y anillo que calce en la aguja el citómetro

7.3 Material médico Fungible

Reactivos

- Perla calibradora de citómetro de flujo de 8 colores
- Perla calibradora para citometría de flujo 7 colores
- Perlas de compensación de 8 colores
- Anticuerpos monoclonales según panel

Materiales

- Guantes de nitrilo descartables
- Lentes protectores de policarbonato





PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San
Borja



Soluciones

- Solución buffer para citometría de flujo
- Solución shut down para el citómetro de flujo
- Solución de limpieza para el citómetro de flujo
- Agua destilada estéril
- PBS (10mM fosfato Na + K + 0.9% cloruro de sodio pH 7.4) con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio
- PBS (10mM fosfato Na + K + 0.9% cloruro de sodio pH 7.4) con 0.5% albúmina bovina sérica
- Solución lisante de glicol dietileno y formaldehido
- Solución permeabilizante para citometría de flujo

8. Procedimiento

TIEMPO: 50 minutos

8.1 Recepción de la Muestra

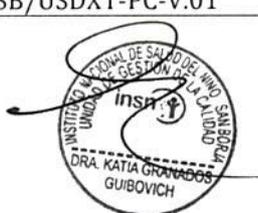
Pasos:

1. Revisar que la muestra no presente coágulos, que el tubo se encuentre rotulado.
2. Además se debe adjuntar una lámina realizada al momento de la punción, para calcular la celularidad.
3. La orden debe indicar los datos completos del paciente como nombre, historia clínica, edad, diagnóstico, solicitud de estudio, datos clínicos, último examen hematológico, y demás.
4. Anotar datos del paciente en el cuaderno de registro, designándole el código interno de citometría de flujo (CF).
5. Trillado de estudio base de citometría y otros controles, deben ser anotados y adjuntados a la orden.

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-
SB/USDXT-PC-V.01

Página : 23 de 56

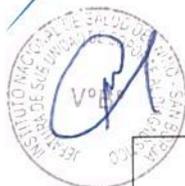




8.2 Preparación de Muestra

Pasos:

1. Revisar al microscopio la lámina para calcular celularidad de la muestra.
2. Rotular tubos 12x75 mm con el código interno (CF).
3. Pipetear 250 μ L o más de sangre medular según celularidad de la muestra.
4. Agregar 5 o 7 μ L de anticuerpo de superficie a todos los tubos según diagnóstico (anexo 1)
5. Vórtex e incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
6. A los tubos con marcación sólo de superficie, adicionar 2 mL de solución lisante para destruir la serie roja. Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante para la eliminación sin tocar el pellet de la serie blanca. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio. Vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante para la eliminación sin tocar el pellet de la serie blanca. Resuspender con 500 μ L de PBS con 0.5% albúmina bovina. Vórtex y guardar a 4 °C en oscuridad hasta la lectura o adquisición.
7. A los tubos con marcación citoplasmática, primero adicionar 100 μ L de solución fijadora. Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio, vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante. Luego, adicionar 100 μ L de solución permeabilizante, y agregar 5 o 7 μ L de anticuerpo para marcación citoplasmática según indica el panel. Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio, vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio. Vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante sin tocar el pellet de la serie blanca. Resuspender con 500 μ L de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica. Vórtex y guardar a 4 °C en oscuridad hasta la lectura o adquisición.





PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San
Borja



8.3 Adquisición en el Clitómetro

Pasos:

1. Aperturar el área de trabajo de Diva (Workspace) en donde se tiene:
 - Browser: ventana donde se organizan las carpetas, subcarpetas y archivos de cada usuario.
 - Instrument Cytometer: panel de los controles del citómetro, parámetros, compensaciones, threshold.
 - Acquisition Dashboard: panel de adquisición (comenzar adquisición, salvar eventos, regiones)
 - Inspector: Información detallada sobre la ventana o plot que se encuentre seleccionado.
 - Global worksheet: plantilla de trabajo que contiene los plots, estadísticas, información sobre el experimento y anotaciones del usuario.
2. Realizados los pasos para poner en marcha el citómetro (hacer 1° un “fluidics startup”, duración 7 minutos, 2° cleaning modes y conectar el citómetro).
3. Proceder con el protocolo de lavado diario del equipo, usando solución conrad y agua destilada.
4. Seleccionar carpeta y abrir un experimento designándole el nombre del código interno.
5. El experimento lleva asociada una plantilla o Global Worksheet, seleccionamos la worksheet y con botón derecho activamos Apply Analysis Template. Además; también está asociado el Cytometer Setting donde se busca y aplica el archivo del último set up.
6. Se selecciona el experimento y se crean los tubos. Luego se abre en Experiment la ventana del Layout donde se especificará los anticuerpos usados en el experimento según la plantilla.
7. En Acquisition Dashboard especificamos el número de eventos a grabar y la velocidad de lectura. La velocidad o flow rate recomendada es “MEDIUM”.
8. Se procede con la adquisición del tubo. Visualizamos como se van adquiriendo los eventos y se ajusta el threshold si es necesario, y pulsar Record para grabar los eventos.
9. El número de eventos a adquirir son 2 000 000 eventos totales.

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-
SB/USDXT-PC-V.01

Página : 25 de 56





8.4 Análisis de Datos

Pasos:

1. Analizar los datos adquiridos con el programa Infinicyt.
2. Luego de aparecer la ventana de análisis manual asociada al perfil “por defecto”, abrir el creado para las necesidades del usuario.

8.5 Reporte de Datos

Pasos:

1. El resultado final con el nombre, otros datos del paciente, los gráficos analizados y la estadística se efectúa en una plantilla Word.
2. La orden del paciente se entregará a secretaría de la sub unidad de Patología Clínica para su registro, quien remite al personal técnico para su ingreso y registro así como demás trámites contables (SIS).

8.6 Entrega de Resultados

Pasos:

1. Los resultados del estudio de enfermedad mínima residual de LA serán entregados inmediatamente de haberse concluido el análisis.

8.7 Archivo de Resultados

Pasos:

1. La data virtual del citómetro será almacenada en unidades de almacenamiento de manera mensual y anual.
2. El registro físico del resultado será archivado por el personal del área.



9. Complicaciones

Ninguna.





10. Anexos

ANEXO 1

EMR LLA-B

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	CD20 5	CD45 7	CD81 5	CD66c/CD123 7/4	CD34 5	CD19 5	CD10 4	CD38 7

CD66c PE/CD123 PE es opcional. Si CD66c fue positivo en diagnóstico sólo usar éste, e igual con CD123.

Marcar CD66c y CD123 a la vez cuando no se tiene inmunofenotipo diagnóstico.

≥10% blastos en lámina, adquirir 100 000 eventos

<10% blastos en lámina, adquirir 2 000

000 eventos

EMR LLA-T

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	cyCD3 5	CD45 5	nuTdT 5	CD99 5	CD5 10	CD19 5	CD7 4	smCD3 5
Tubo 2	cyCD3 5	CD45 5	CD2 10	CD56 5	CD4 7	CD8 5	CD1a 10	smCD3 5

Adquirir 2 000 000 eventos totales

EMR EARLY LLA-T

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	cyCD3 5	CD45 5	nuTdT 5	CD99 5	CD5 10	CD19 5	CD7 4	smCD3 5
Tubo 2	cyCD3 5	CD45 5	CD8 5	-	CD4 7	HLADR 5	CD117 4	smCD3 5

Tubo 2: CD8 FITC es opcional, se puede cambiar con CD2

Adquirir 2 000 000 eventos totales

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-
SB/USDXT-PC-V.01

Página : 27 de 56





EMRLPA

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	AF 750
Tubo 1	HLADR 5	CD45 7	CD15 10	CD13 7	CD34 7	CD117 5	CD11b 5	CD38 5
Tubo 2	HLADR 5	CD45 7	cyMPO 7	CD13 7	CD34 7	CD117 5	CD33 4	CD14 5

Tubo 2: CD13 PE es opcional si en diagnóstico hubo componente basofílico marcar CD203c PE
Adquirir 2 000 000 eventos totales

EMR LMA M0, M1, M2

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	HLADR 5	CD45 5	CD16 5	CD13 7	CD34 7	CD117 5	CD11b 5	CD10 5
Tubo 2	HLADR 5	CD45 5	CD15 10	CD64 5	CD34 7	CD117 5	CD33 5	CD38 5
Tubo 3	HLADR 5	CD45 5	-	CD56 5	CD34 7	CD117 5	CD7 4	CD19 5

Tubo 1: CD10 APCH7 es opcional, si en diagnóstico expresó

CD19 cambiarlo

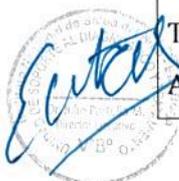
Tubo 2 es opcional, según diagnóstico se marca

CD7 FITC o CD15 FITC

Tubo 2: CD64 PE es opcional, si en diagnóstico expresó CD56 cambiarlo

Tubo 3 es opcional, mirar fenotipo diagnóstico

Adquirir 2 000 000 eventos totales





EMR LMA M4, M5

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	HLADR 5	CD45 5	CD16 5	CD13 7	CD34 5	CD117 5	CD11b 5	CD10 5
Tubo 2	HLADR 5	CD45 5	CD35 5	CD64 5	CD34 5	CD117 5	IREM2 5	CD14 5
Tubo 3	HLADR 5	CD45 5	CD15 10	CD56 5	CD34 5	CD117 5	CD33 5	CD38 4

Tubo 3 es opcional, según diagnóstico se marca CD7 FITC o CD15 FITC

Adquirir 2 000 000 eventos totales

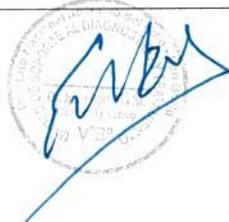
EMR LMA M7

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	HLADR 5	CD45 5	CD36 5	CD13 5	CD34 5	CD117 5	CD11b 5	CD71 5
Tubo 2	HLADR 5	CD45 5	CD42a/CD61 3/4	CD64 5	CD34 5	CD117 5	CD42b 3	-
Tubo 3	HLADR 5	CD45 5	CD41 3	CD56 5	CD34 5	CD117 5	CD7 4	CD38 4

El CD7 APC es opcional, marcar sólo si expresó en diagnóstico

El CD56 PE es opcional, marcar sólo si expresó en diagnóstico

Adquirir 2 000 000 eventos totales





EMR LEUCEMIA CEL.

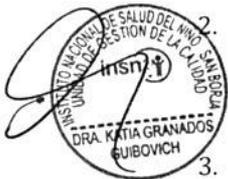
DENDRITICAS

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	HLADR 5	CD45 5	CD16 5	CD13 5	CD34 5	CD117 5	CD11b 5	CD10 5
Tubo 2	HLADR 5	CD45 5	CD36 5	CD56 5	CD34 5	CD117 5	CD33 5	CD71 5
Tubo 3	CD4 5	CD45 5	CD7 10	CD203c 10	CD34 5	CD117 5	CD123 5	

Tubo 3: según diagnóstico se marca CD4 V450 o HLADR V450, y CD7 FITC o CD15 FITC
Adquirir 2 000 000 eventos totales

11. Bibliografía

1. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. Euroflow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* (2012) 26, 1908-1975.
2. Kalina, T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, et al. Euroflow. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* (2012) 26, 1986–2010.
3. Ortolani C. Flow cytometry of hematological malignancies. Italy, 2011.
4. Swerdlow SH, Campo F, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
5. Esther Domingo Rodríguez. Tesis Doctoral: Desarrollo de una técnica de citometría de flujo multiparamétrica que permite detectar enfermedad mínima residual por debajo del límite establecido. Universidad de Navarra, España 2011





PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San
Borja



IV. Procedimientos de Estudio de Leucemia Aguda por Citometría de Flujo de 8 Colores

1. Título

Procedimiento de Estudio de Leucemia Aguda por Citometría de Flujo de 8 colores.

2. Código

CPT: 88189

3. Objetivo

Detección del linaje de células inmaduras o blastos con fenotipo patológico como ayuda al diagnóstico de leucemia aguda.

4. Indicaciones

INDICACIONES ABSOLUTAS.- Estandarizar el proceso a realizarse para el estudio de leucemias agudas en muestra de médula ósea por Citometría de flujo

INDICACIONES RELATIVAS.- Estandarizar el proceso a realizarse para el estudio de leucemias agudas en muestra de sangre periférica por Citometría de flujo

5. Contraindicaciones

Ninguna.

6. Responsables

- Médico Patólogo Clínico.
- Tecnólogo Clínico.
- Biólogo.
- Técnico de Laboratorio.

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-
SB/USDXT-PC-V.01

Página : 31 de 60





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



7. Materiales e Insumos

7.1 Equipos Biomédicos

- Citómetro de Flujo FACS Canto II de 8 colores: V450, V500, FITC, PE, PerCP Cy5.5, PE Cy7, APC y APC-H7
- Refrigeradora/ conservadora de 4 °C para reactivos.
- Agitador de tubos o vortex
- Reloj de tiempo con alarma
- Centrífuga de mesa con buckets para tubos de diferente tamaño.
- Bomba de succión aspiración

7.2 Material médico no Fungible

- Tubo plástico 3 mL al vacío con EDTA K2
- Gradillas para los tubos solicitados
- Micropipeta de volumen variable 100 µL - 1000 µL
- Micropipeta de volumen variable 10 µL - 200 µL
- Micropipeta de volumen variable 0.5 µL - 10 µL
- Punteras descartables de 100 µL – 1000 µL
- Punteras descartables de 10 µL – 200 µL
- Punteras descartables de 0.5 µL – 10 µL
- Tubos de poliestireno 12 x 75 mm de 5 mL, con tapa y anillo que calce en la aguja el citómetro



7.3 Material médico Fungible

Reactivos

- Perla calibradora de citómetro de flujo de 8 colores
- Perla calibradora para citometría de flujo 7 colores
- Perlas de compensación de 8 colores
- Anticuerpos monoclonales según panel



Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-SB/USDXT-PC-V.01

Página : 32 de 60





PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San
Borja



Materiales

- Guantes de nitrilo descartables
- Lentes protectores de policarbonato

Soluciones

- Solución buffer para citometría de flujo
- Solución shut down para el citómetro de flujo
- Solución de limpieza para el citómetro de flujo
- Agua destilada estéril
- PBS (10mM fosfato Na + K + 0.9% cloruro de sodio pH 7.4) con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio
- PBS (10mM fosfato Na + K + 0.9% cloruro de sodio pH 7.4) con 0.5% albúmina bovina sérica
- Solución lisante de glicol dietileno y formaldehido
- Solución permeabilizante para citometría de flujo

8. Procedimiento

TIEMPO: 50 minutos

8.1 Recepción de la Muestra

Pasos:

1. Revisar que la muestra no presente coágulos, que el tubo se encuentre rotulado.
2. Además se debe adjuntar una lámina realizada al momento de la punción, para calcular la celularidad.
3. La orden debe indicar los datos completos del paciente como nombre, historia clínica, edad, diagnóstico, solicitud de estudio, datos clínicos, último examen hematológico, y demás.
4. Anotar datos del paciente en el cuaderno de registro, designándole el código interno de citometría de flujo (CF).

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-
SB/USDXT-PC-V.01

Página : 33 de 56

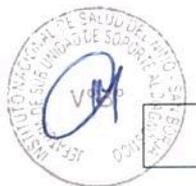




8.2 Preparación de Muestra

Pasos:

1. Revisar al microscopio la lámina para calcular celularidad de la muestra.
2. Rotular tubos 12x75 mm con el código interno (CF).
3. Pipetear 250 µL o más de sangre medular según celularidad de la muestra.
4. Agregar 5 o 7 µL de anticuerpo de superficie a todos los tubos según diagnóstico (anexo 1)
5. Vórtex e incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
6. Adicionar 100 µL de solución fijadora. Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio, vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante. Luego, adicionar 100 µL de solución permeabilizante, y agregar 5 o 7 µL de anticuerpo para marcación citoplasmática según el panel. Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio, vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio. Vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante sin tocar el pellet de la serie blanca. Resuspender con 500 µL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica. Vórtex y guardar a 4 °C en oscuridad hasta la lectura o adquisición.
7. Según el linaje de los blastos determinado por el tubo screening se procede a realizar el marcaje del panel complementario.
8. Para el panel complementario, rotular tubos 12x75 mm con el código interno (CF).
9. Pipetear 50 µL o más de sangre medular según celularidad de la muestra.
10. Agregar 5 o 7 µL de anticuerpo de superficie a todos los tubos según el panel complementario (Anexo 2)
11. Vórtex e incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
12. Solamente a los tubos con marcaje de superficie, adicionar 2 mL de solución lisante para destruir la serie roja. Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.





Centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante y eliminarlo sin tocar el pellet de la serie blanca. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio. Vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos.

Aspirar el sobrenadante y eliminarlo sin tocar el pellet de la serie blanca. Resuspender con 500 µL de PBS con 0.5% albúmina bovina. Vórtex y guardar a 4 °C en oscuridad hasta la lectura o adquisición.

- 13. A los tubos con marcado citoplasmático, adicionar 100 µL de solución fijadora. Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, luego adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio, vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante. Luego, adicionar 100 µL de solución permeabilizante, y agregar 7 µL de anticuerpo para marcación citoplasmática según indica el panel. Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio, vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio. Vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante sin tocar el pellet de la serie blanca. Resuspender con 500 µL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica. Vórtex y guardar a 4 °C en oscuridad hasta la lectura o adquisición

8.3 Adquisición en el Citometro

Pasos:

- 1. Aperturar el área de trabajo del Software Diva (Workspace) en donde se identifican:
 - a. Browser: ventana donde se organizan las carpetas, subcarpetas y archivos de cada usuario.
 - b. Instrument Cytometer: panel de los controles del citómetro, parámetros, compensaciones, threshold.
 - c. Acquisition Dashboard: panel de adquisición (comenzar adquisición, salvar eventos, regiones)
 - d. Inspector: Información detallada sobre la ventana o plot que se encuentre seleccionado.

Fecha : Enero 2018	Código : M-009/INSN-SB/USDXT-PC-V.01	Página : 35 de 56
--------------------	--------------------------------------	-------------------





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



e. Global worksheet: plantilla de trabajo que contiene los plots, estadísticas, información sobre el experimento y anotaciones del usuario.

2. Establecer en marcha el citómetro (hacer 1° un “fluidics startup”, duración 7 minutos, 2° cleaning modes y conectar el citómetro).
3. Proceder con el protocolo de lavado diario del equipo, usando solución conrad y agua destilada.
4. Seleccionar carpeta y abrir un experimento designándole el nombre del código interno.
5. El experimento lleva asociada una plantilla o Global Worksheet, seleccionamos la worksheet y con botón derecho activamos Apply Analysis Template. Además; también está asociado el Cytometer Setting donde se debe buscar y aplicar el archivo del último set up.
6. Seleccionar el experimento y se crearán los tubos. Luego abrir en Experiment la ventana del Layout donde se especificará los anticuerpos usados en el experimento según la plantilla.
7. En Acquisition Dashboard especificaremos el número de eventos a grabar y la velocidad de lectura. La velocidad o flow rate recomendada es “MEDIUM”.
8. Se procede con la adquisición del tubo. Visualizar como se van adquiriendo los eventos y ajustar el threshold si fuese necesario, y pulsar Record para grabar los eventos.
9. El número de eventos a adquirir son 100 000 eventos totales.

8.4 Análisis de Datos

Pasos:

1. Analizar los datos adquiridos con el programa Infinicyt.
2. Luego de aparecer la ventana de análisis manual asociada al perfil “por defecto”, abrir el creado para las necesidades del usuario.

8.5 Reporte de Datos

Pasos:

1. El resultado final con el nombre, otros datos del paciente, los gráficos analizados y la estadística se efectúa en una plantilla Word.





2. La orden del paciente se entregará a secretaría del Servicio de Patología Clínica para su registro, quien remite al personal técnico para su ingreso y registro así como demás trámites contables (SIS).

8.6 Entrega de Resultados

Los resultados del estudio de linaje de leucemia aguda serán entregados inmediatamente de haberse concluido el análisis.

8.7 Archivo de Resultados

Pasos:

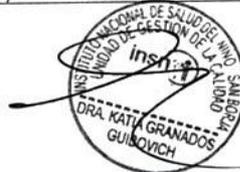
1. La data virtual del citómetro será almacenada en unidades de almacenamiento de manera mensual y anual.
2. El registro físico del resultado será archivado por el personal del área.

9. Complicaciones

Ninguna.

10. Anexos

Fecha : Enero 2018	Código : M-009/INSN-SB/USDXT-PC-V.01	Página : 37 de 56
--------------------	--------------------------------------	-------------------





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



ANEXO 1

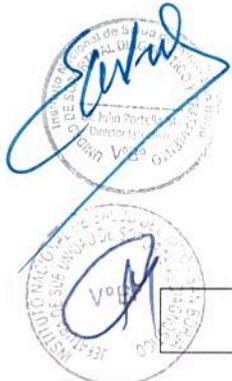
SCREENING LA

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
ALOT	cyCD3 7	CD45 5	cyMPO 5	cyCD79 a 5	CD34 7	CD19 5	CD7 4	-
<p>Blastos CD19, cyCD79a positivos, cyMPO negativo: realizar panel complementario de LLA B cyCD3 opcional, agregar si CD7 es positivo: si ambos salen positivos realizar panel complementario LLA T Blastos cyMPO positivo, o cyCD3/CD7 y CD19/CD79a negativos: realizar panel complementario de LMA Adquirir 100 000 eventos totales</p>								

ANEXO 2

COMPLEMENTARIO LLA-B

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	CD20 5	CD45 5	CD15/CDw65 5/5	CD66c 5	CD34 5	CD19 5	CD10 4	CD38 5
Tubo 2	CD9 5	CD45 5	cyIgM 5	CD123 5	-	CD19 5	smlgM 4	CD81 5
Tubo 3	-	CD45 5	nuTdT 5	NG2 5	-	CD19 5	-	CD24 5
<p>Tubo 2: hacer un lavado con buffer+albúmina Tubo 3: NG2 es opcional, sólo marcarlo si CD10 salió negativo Adquirir 100 000 eventos totales</p>								





COMPLEMENTARIO LLA-T

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	cyCD3 7	CD45 5	nuTdT 5	CD99 5	CD5 10	CD10 5	CD1a 10	smCD3 5
Tubo 2	cyCD3 7	CD45 5	CD2 10	CD56 5	CD4 7	CD8 5	CD7 4	smCD3 5
Tubo 3	cyCD3 7	CD45 5	TCRgd 5	TCRab 7	CD33 10	CD117 5	CD123 4	smCD3 5
Tubo 4	cyCD3 7	CD45 5	CD44 7	CD13 7	–	HLADR 5	CD45RA 5	smCD3 5

Tubo 4 es opcional, sólo se marca si se sospecha de LLA T estadio early-T

Adquirir 100 000 eventos totales

COMPLEMENTARIO LPA

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	HLADR 7	CD45 5	CD16 5	CD13 7	CD34 7	CD117 5	CD11b 5	CD38 5
Tubo 2	HLADR 7	CD45 5	CD15 10	CD56 10	–	CD117 5	CD33 5	CD14 5
Tubo 3	HLADR 7	CD45 5	CD2 10	–	–	CD117 5	–	–

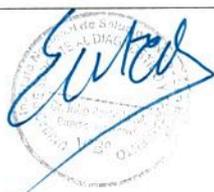
Tubo 3 es opcional, se marca si hay sospecha de LPA hipogranular

Adquirir 100 000 eventos totales

COMPLEMENTARIO LMA M0, M1, M2

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	HLADR 7	CD45 5	CD16 5	CD13 7	CD34 7	CD117 5	CD11b 4	CD38 5
Tubo 2	HLADR 7	CD45 5	CD15 10	CD64 5	CD34 7	CD117 5	CD123 4	CD14 5
Tubo 3	HLADR 7	CD45 5	CD36 5	CD56 5	CD34 7	CD117 5	CD33 5	CD71 5

Adquirir 100 000 eventos totales





COMPLEMENTARIO LMA M4, M5

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	HLADR 7	CD45 5	CD16 5	CD13 7	CD34 7	CD117 5	CD11b 5	CD38 5
Tubo 2	HLADR 7	CD45 5	CD35 5	CD64 5	CD34 7	CD117 5	IREM2 5	CD14 5
Tubo 3	HLADR 7	CD45 5	CD36 5	NG2 10	CD34 7	CD117 5	CD123 5	CD71 5

Tubo 3: NG2 es opcional, se marca si es LMA M5

Adquirir 100 000 eventos totales

COMPLEMENTARIO LMA M7

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	HLADR 7	CD45 5	CD16 5	CD13 7	CD34 7	CD117 5	CD11b 5	CD38 5
Tubo 2	HLADR 7	CD45 5	CD36 5	CD56 10	CD34 7	CD117 5	CD33 5	CD71 5
Tubo 3	HLADR 7	CD45 5	CD42a/CD61 3/4	–	CD34 7	CD117 5	CD123 5	–
Tubo 4	HLADR 7	CD45 5	CD41 3	–	CD34 7	CD117 5	CD42b 3	–

Aplicar panel completo a pacientes pediátricos con Sd Down.

Adquirir 100 000 eventos totales

COMPLEMENTARIO LEUCEMIA CEL. DENDRITICAS

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	HLADR 7	CD45 5	CD16 5	CD13 7	CD34 7	CD117 5	CD11b 5	CD38 5
Tubo 2	HLADR 7	CD45 5	CD35 5	CD64 5	CD34 7	CD117 5	IREM2 5	CD14 5
Tubo 3	HLADR 7	CD45 5	CD36 5	NG2 10	CD34 7	CD117 5	CD7 5	CD71 5
Tubo 4	CD4 5	CD45 5	–	CD203c 10	CD34 7	CD117 5	CD123 5	–

Tubo 4: Anticuerpo de V450 es opcional, o repetimos HLADR o marcamos CD4

Adquirir 100 000 eventos totales





PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San
Borja



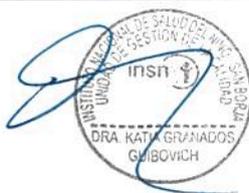
11. Bibliografía

1. Van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, Van der Velden V, Flores-Montero J, et. Euroflow antibody panels for standardized n- dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia (1912), 26, 1908-1975.
2. Swerdlow SH, Campo F, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: A report of French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med. 1985;103(4):620-5.
4. Euroflow Standard Operating Procedure for sample preparation and staining. Version 1.2.1 2015. Noviembre 11. Juan Flores- Montero.

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-
SB/USDXT-PC-V.01

Página : 41 de 60





V. Procedimiento de Estudio de Líquido Cefalorraquídeo por Citometría de Flujo

1. Titulo

Procedimiento de Estudio de Líquido Cefalorraquídeo por Citometría de Flujo.

2. Codigo

CPT: 88187

3. Objetivo

Detección de infiltración meningoencefálica de células maduras o blastos con fenotipo patológico.

4. Indicaciones

INDICACIONES ABSOLUTAS.- Estandarizar el proceso a realizarse para el estudio de infiltración de leucemias agudas en muestra de líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo

INDICACIONES RELATIVAS.- Estandarizar el proceso a realizarse para el estudio de infiltración de leucemias agudas en muestra de líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo de los pacientes de nuestra institución.

5. Contraindicaciones

Ninguna.

6. Responsables

- * Médico Patólogo Clínico.
- * Tecnólogo Clínico.
- * Biólogo.
- * Técnico de Laboratorio.





7. Materiales e Insumos

7.1 Equipos Biomédicos

- Citómetro de Flujo FACS Canto II de 8 colores: V450, V500, FITC, PE, PerCP Cy5.5, PE Cy7, APC y APC-H7
- Refrigeradora/ conservadora de 4 °C para reactivos.
- Agitador de tubos o vortex
- Reloj de tiempo con alarma
- Centrífuga de mesa con buckets para tubos de diferente tamaño.
- Bomba de succión aspiración
- Cabina de flujo laminar

7.2 Material médico no Fungible

- Tubo plástico 3 mL al vacío con EDTA K2
- Gradillas para los tubos solicitados
- Micropipeta de volumen variable 100 µL - 1000 µL
- Micropipeta de volumen variable 10 µL - 200 µL
- Micropipeta de volumen variable 0.5 µL - 10 µL
- Punteras descartables de 100 µL – 1000 µL
- Punteras descartables de 10 µL – 200 µL
- Punteras descartables de 0.5 µL – 10 µL
- Tubos de poliestireno 12 x 75 mm de 5 mL, con tapa y anillo que calce en la aguja el citómetro

7.3 Material médico Fungible

Reactivos

- Perla calibradora de citómetro de flujo de 8 colores
- Perla calibradora para citometría de flujo 7 colores
- Perlas de compensación de 8 colores
- Solución estabilizadora de células sanguíneas.
- Anticuerpos monoclonales según panel





Materiales

- Guantes de nitrilo descartables
- Lentes protectores de policarbonato

Soluciones

- Solución buffer para citometría de flujo
- Solución shut down para el citómetro de flujo
- Solución de limpieza para el citómetro de flujo
- Agua destilada estéril
- PBS (10mM fosfato Na + K + 0.9% cloruro de sodio pH 7.4) con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio
- PBS (10mM fosfato Na + K + 0.9% cloruro de sodio pH 7.4) con 0.5% albúmina bovina sérica
- Solución lisante de glicol dietileno y formaldehido
- Solución permeabilizante para citometría de flujo

8. Procedimiento

TIEMPO: 50 minutos

8.1 Recepción de la Muestra

Pasos:

1. El tubo con EDTA K2 debe contener 100 uL de solución estabilizadora de células sanguíneas previa extracción de la muestra de LCR. El tubo será proporcionado por el laboratorio y tendrá un rótulo de Transfix adicionado.
2. Revisar que la muestra sea transparente, sin presencia de sangre o precipitados, y verificar que el rotulado corresponda con el de la orden médica.
3. La orden debe indicar los datos completos del paciente como nombre, historia clínica, edad, diagnóstico, solicitud de estudio, datos clínicos, último examen hematológico, y otros datos médicos relevantes.
4. Anotar los datos del paciente en el cuaderno de registro y designar código interno de citometría de flujo (CF).





8.2 Preparación de Muestra

Pasos:

1. Rotular 1 tubo 12x75 mm con el código interno (CF). Trasvasar a este tubo todo el contenido de LCR enviado.
2. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio, vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante.
3. Agregar 2 μ L de anticuerpo de superficie al tubo según indica el panel (anexo 1).
4. Vórtex e incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
5. Si el panel indica marcación citoplasmática, a continuación se procede con lo siguiente: adicionar 50 μ L de solución fijadora. Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio, vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante. Luego, adicionar 50 μ L de solución permeabilizante, y agregar 2 μ L de anticuerpo para marcación citoplasmática según indica el panel. Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio, vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante sin tocar el pellet de la serie blanca.

Resuspender con 500 μ L de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica. Vórtex y guardar a 4 °C en oscuridad hasta la lectura o adquisición.

6. Si el panel indica sólo marcación de membrana, a continuación se procede con lo siguiente: agregar 2 μ L de anticuerpo de superficie al tubo según el panel (Anexo 1). Vórtex e incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Adicionar 1 mL de solución lisante para destruir la serie roja. Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Centrifugar a 540g por 5 minutos.

Aspirar el sobrenadante para la eliminación sin tocar el pellet de la serie blanca. Adicionar 2 mL de PBS con 0.5% albúmina bovina sérica y 0.09% azida de sodio. Vórtex y centrifugar a 540g por 5 minutos. Aspirar el sobrenadante para la eliminación sin tocar el pellet de la serie blanca. Resuspender con 500 μ L de PBS con 0.5% albúmina bovina. Vórtex y guardar a 4 °C en oscuridad hasta la lectura o adquisición.

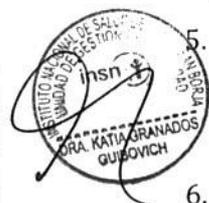




8.3 Adquisición en el Citometro

Pasos:

1. Aperturar el área de trabajo de Diva (Workspace) en donde se identifican:
 - a) Browser: ventana donde se organizan las carpetas, subcarpetas y archivos de cada usuario.
 - b) Instrument Cytometer: panel de los controles del citómetro, parámetros, compensaciones, threshold.
 - c) Acquisition Dashboard: panel de adquisición (comenzar adquisición, salvar eventos, regiones)
 - d) Inspector: Información detallada sobre la ventana o plot que se encuentre seleccionado.
 - e) Global worksheet: plantilla de trabajo que contiene los plots, estadísticas, información sobre el experimento y anotaciones del usuario.
2. Establecer en marcha el citómetro (hacer 1° un “fluidics startup”, duración 7 minutos, 2° cleaning modes y conectar el citómetro).
3. Proceder con el protocolo de lavado diario del equipo, usando solución conrad y agua destilada.
4. Seleccionar carpeta y abrir un experimento designándole el nombre del código interno.
5. El experimento lleva asociada una plantilla o Global Worksheet, seleccionamos la worksheet y con botón derecho activamos Apply Analysis Template. Además; también está asociado el Cytometer Setting donde se busca y aplica el archivo del último set up.
6. Se selecciona el experimento y se crean los tubos. Luego abrir en Experiment la ventana del Layout donde se especificará los anticuerpos usados en el experimento según la plantilla.
7. Seleccionar el tubo y activar en la pestaña Threshold cambiando el FSC a 25,000.
8. En Acquisition Dashboard especificamos el número de eventos a grabar y la velocidad de lectura. La velocidad o flow rate recomendada es “MEDIUM”.
9. Se procede con la adquisición del tubo. Visualizamos como se van adquiriendo los eventos y se ajusta el threshold si es necesario, y pulsar Record para grabar los eventos.
10. El número de eventos a adquirir son 100 000 eventos totales.





8.4 Análisis de Datos

Pasos:

1. Analizar los datos adquiridos con el programa Infinicyt.
2. Luego de aparecer la ventana de análisis manual asociada al perfil “por defecto”, abrir el creado para las necesidades del usuario.

8.5 Reporte de Datos

Pasos:

1. El resultado final con el nombre, otros datos del paciente, los gráficos analizados y la estadística se efectúa en una plantilla Word.
2. La orden del paciente se entregará a secretaría de la sub unidad de Patología Clínica para su registro, quien remite al personal técnico para su ingreso y registro así como demás trámites contables (SIS).

8.6 Entrega de Resultados

Los resultados del estudio de enfermedad mínima residual de LA serán entregados inmediatamente de haberse concluido el análisis.

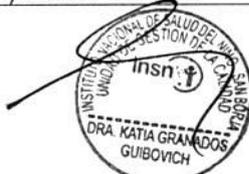
8.7 Archivo de Resultados

Pasos:

1. La data virtual del citómetro será almacenada en unidades de almacenamiento de manera mensual y anual.
2. El registro físico del resultado será archivado por el personal del área.

9. Complicaciones

Ninguna.





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



10. Anexos

ANEXO 1

PANEL

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
LLA-B	CD20	CD45	-	-	CD34	CD19	CD10	CD3/CD14
	2	2			2	2	2	2/2
Adquirir toda la muestra con threshold FSC a 25 000								

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
LLA-T	cyCD3	CD45	nuTdT	CD99	CD3	CD56	CD7	CD14
	2	2	2	2	2	2	2	2
Adquirir toda la muestra con threshold FSC a 25 000								

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
LMA M0, M1, M2	HLADR	CD45	-	CD13	CD34	CD117	CD7	CD3/CD14
	2	2		2	2	2	2	2/2
Adquirir toda la muestra con threshold FSC a 25 000								
CD7 APC ses opcional, marcar según diagnóstico.								


 DE SALUD DEL NIÑO
 GESTIÓN DE LA CALIDAD
 LA. KATIA BRANADOS GUBOVICH


 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
 DE SAN BORJA

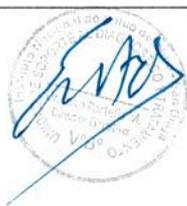

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
 DE SAN BORJA



	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE- Cy7	APC	APC-H7
LMA M3	HLADR	CD45	CD15	CD1 3	-	CD117	CD3 3	CD3/CD1 4
	2	2	2	2		2	2	2/2
Adquirir toda la muestra con threshold FSC a 25 000								

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE- Cy7	APC	APC-H7
LMA M4, M5	HLADR	CD45	CD35	CD6 4	CD34	CD117	IREM 2	CD3/CD1 4
	2	2	2	2	2	2	2	2/2
Adquirir toda la muestra con threshold FSC a 25 000								

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE- Cy7	APC	APC-H7
Burkitt o LBDCG	CD20	CD45	smlgL	smlg K	-	CD19	CD1 0	CD3/CD1 4
	2	2	2	2		2	2	2/2
Adquirir toda la muestra con threshold FSC a 25 000								





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



11. Bibliografía

1. Van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, Van der Velden V, Flores-Montero J, et. Euroflow antibody panels for standardized n- dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia (1912), 26, 1908-1975.
2. Swerdlow SH, Campo F, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: A report of French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med. 1985;103(4):620-5.
4. Euroflow Standard Operating Procedure for sample preparation and staining. Version 1.2.1 2015. Noviembre 11. Juan Flores- Montero.



Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-SB/USDXT-PC-V.01

Página : 50 de 56



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San
Borja



VI. Procedimiento de Recuento de Linfocitos T CD4/CD8 por Citometría de Flujo

1. Título

Procedimiento de recuento de Linfocitos T CD4/CD8 por Citometría de Flujo.

2. Código

CPT: 88201

3. Objetivo

Recuento de linfocitos T colaboradores (CD4+) y T citotóxicos (CD8+) en sangre periférica.

4. Indicaciones

INDICACIONES ABSOLUTAS.- Estandarizar el proceso a realizarse para el recuento de linfocitos T CD4/CD8 en sangre periférica por citometría de flujo

INDICACIONES RELATIVAS.- Estandarizar el proceso a realizarse para el recuento de linfocitos T CD4/CD8 en sangre periférica por citometría de flujo de los pacientes de nuestra institución.

5. Contraindicaciones

Ninguna.

6. Responsables

- Médico Patólogo Clínico.
- Tecnólogo Médico.
- Biólogo.
- Técnico de Laboratorio.

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-
SB/USDXT-PC-V.01

Página : 51 de 60





7. Materiales e Insumos

7.1 Equipos Biomédicos

- Citómetro de Flujo FACS Canto II de 8 colores: V450, V500, FITC, PE, PerCP Cy5.5, PE Cy7, APC y APC-H7
- Refrigeradora/ conservadora de 4 °C para reactivos.
- Agitador de tubos o vortex
- Reloj de tiempo con alarma

7.2 Material médico no Fungible

- Tubo plástico 3 mL al vacío con EDTA K2
- Gradillas para los tubos solicitados
- Micropipeta de volumen variable 100 µL - 1000 µL
- Micropipeta de volumen variable 10 µL - 200 µL
- Micropipeta de volumen variable 0.5 µL - 10 µL
- Punteras descartables de 100 µL – 1000 µL
- Punteras descartables de 10 µL – 200 µL
- Punteras descartables de 0.5 µL – 10 µL
- Tubos de poliestireno 12 x 75 mm de 5 mL, con tapa y anillo que calce en la aguja el citómetro

7.3 Material médico Fungible

Reactivos

- Perla calibradora de citómetro de flujo de 8 colores
- Perla calibradora para citometría de flujo 7 colores
- Perlas de compensación de 8 colores
- Anticuerpos:
 - CD4 V450
 - CD45 V500
 - CD8 FITC
 - CD3 APC





PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San
Borja



Materiales

- Guantes de nitrilo descartables
- Lentes protectores de policarbonato

Soluciones

- Solución buffer para citometría de flujo
- Solución shut down para el citómetro de flujo
- Solución de limpieza para el citómetro de flujo
- Agua destilada estéril
- Solución lisante de glicol dietileno y formaldehído

8. Procedimiento

TIEMPO: 60 minutos

8.1 Recepción de la Muestra

Pasos:

1. Revisar que la muestra no presente coágulos, que el tubo se encuentre rotulado con nombre completo y número de historia clínica.
2. La orden debe indicar los datos completos del paciente como nombre, historia clínica, edad, diagnóstico, solicitud de estudio, datos clínicos, último examen hematológico, y demás.
3. Recepcionar con resultado u orden de “Recuento de Leucocitos” de la muestra del paciente del mismo día de la orden de citometría de flujo.
4. Anotar datos del paciente en el cuaderno de registro, designándole el código interno de citometría de flujo (CF).

8.2 Preparación de Muestra

Pasos:

1. Rotular un tubo 12x75 mm con el código interno (CF).

Fecha : Enero 2018

Código : M-009/INSN-
SB/USDXT-PC-V.01

Página : 53 de 56



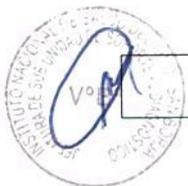


2. Agregar 50 µL de sangre por pipeteo inverso. Este tubo será llamado tubo sin lavados (LNW).
3. Adicionar los anticuerpos según panel (Anexo 1).
4. Vórtex e incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
5. Agregar 450 µL de solución lisante para destruir la serie roja. Vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego proceder inmediatamente con su lectura en el citómetro.

8.3 Adquisición en el Citometro

Pasos:

1. Aperturar el área de trabajo de Diva (Workspace) en donde se tiene:
 - a) Browser: ventana donde se organizan las carpetas, subcarpetas y archivos de cada usuario.
 - b) Instrument Cytometer: panel de los controles del citómetro, parámetros, compensaciones, threshold.
 - c) Acquisition Dashboard: panel de adquisición (comenzar adquisición, salvar eventos, regiones)
 - d) Inspector: Información detallada sobre la ventana o plot que se encuentre seleccionado.
 - e) Global worksheet: plantilla de trabajo que contiene los plots, estadísticas, información sobre el experimento y anotaciones del usuario.
2. Realizados los pasos para poner en marcha el citómetro (hacer 1° un “fluidics startup”, duración 7 minutos, 2° cleaning modes y conectar el citómetro).
3. Proceder con el protocolo de lavado diario del equipo, usando solución conrad y agua destilada.
4. Seleccionar carpeta y abrir un experimento designándole el nombre del código interno.
5. El experimento lleva asociada una plantilla o Globai Worksheet, seleccionamos la worksheet y con botón derecho activamos Apply Analysis Template. Además; también está asociado el Cytometer Setting donde se busca y aplica el archivo del último set up.
6. Se selecciona el experimento y se crean los tubos. Luego se abre en Experiment la ventana del Layout donde se especificará los anticuerpos usados en el experimento según la plantilla.





7. Seleccionar el tubo LNW y activar en la pestaña Threshold “And”, luego click en “Add” y adicionar un nuevo threshold: V500 Value = 2,000. Dejando el threshold FSC = 10,000
8. En Acquisition Dashboard especificamos el número de eventos a grabar y la velocidad de lectura. La velocidad o flow rate recomendada es “MEDIUM”.
9. Se procede con la adquisición del tubo. Visualizamos como se van adquiriendo los eventos y se ajusta el threshold si es necesario, y pulsar Record para grabar los eventos.
10. El número de eventos a adquirir son 100 000 eventos totales.

8.4 Análisis de Datos

Pasos:

1. Analizar los datos adquiridos con el programa Infinicyt.
2. Luego de aparecer la ventana de análisis manual asociada al perfil “por defecto”, abrir el creado para las necesidades del usuario.
3. Con el valor del recuento leucocitario obtenido con el contador hematológico se realiza el cálculo de los valores absolutos.

8.5 Reporte de Datos

Pasos:

1. El resultado final con el nombre, otros datos del paciente, los gráficos analizados y la estadística se efectúa en una plantilla Word.
2. La orden del paciente se entregará a secretaría de la sub unidad de Patología Clínica para su registro, quien remite al personal técnico para su ingreso y registro así como demás trámites contables (SIS).

8.6 Entrega de Resultados

Los resultados del estudio de enfermedad mínima residual de LA serán entregados inmediatamente de haberse concluido el análisis.

8.7 Archivo de Resultados

1. La data virtual del citómetro será almacenada en unidades de almacenamiento de manera mensual y anual.
2. El registro físico del resultado será archivado por el personal del área.

Fecha : Enero 2018	Código : M-009/INSN-SB/USDXT-PC-V.01	Página : 55 de 56
--------------------	--------------------------------------	-------------------





9. Complicaciones

Ninguna.

10. Anexos

ANEXO 1

LINF T CD4/CD8

	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
LNW	CD4	CD45	CD8	-	-	-	CD3	-
	4	5	4				4	
Adquirir 100 000 eventos totales								

11. Bibliografía

1. Van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, Van der Velden V, Flores-Montero J, et. Euroflow antibody panels for standardized n- dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia (1912), 26, 1908-1975.
2. Mandy FF, Nicholson JK, McDougal JS. Guidelines for performing CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep. 2003; 31(52):1-13.
3. Comans-Bitter W, de Groot R, van den Beemd R, Neijens H, Hop W, Groeneveld K, Hooijkaas H, van Dongen J. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Th eJournal of pediatrics Vol 130, Number 3, 1997.

