



RESOLUCION JEFATURAL

Lima, 27 de AGOSTO de 2020

VISTOS:

El Informe N° 0261-2020-DICON/INEN, de la Dirección de Control de Cáncer, el Memorando N° 844-2020-OGPP/INEN de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto y el Informe N° 0578-2020-OAJ/INEN de la Oficina de Asesoría Jurídica; y,

CONSIDERANDO:

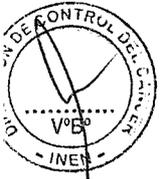
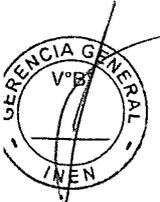
Que a través de la Ley N° 28748, se creó como Organismo Público Descentralizado al Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas - INEN, con personería jurídica de derecho público interno, con autonomía económica, financiera, administrativa y normativa, adscrito al Sector Salud, constituyendo Pliego Presupuestal y calificado como Organismo Público Ejecutor en concordancia con la Ley N° 29158, Ley Orgánica del Poder Ejecutivo y el Decreto Supremo N° 034-2008-PCM;

Que, mediante Decreto Supremo N° 001-2007-SA, publicado en el diario oficial El Peruano, el 11 de enero de 2007, se aprobó el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (ROF - INEN), estableciendo la jurisdicción, funciones generales y estructura orgánica del Instituto, así como las funciones de sus diferentes Órganos y Unidades Orgánicas;

Que, mediante Informe N° 0261-2020-DICON/INEN, la Dirección de Control de Cáncer, remite el Memorando N° 844-2020-OGPP/INEN, de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto, con el cual alcanza los Informes N° 123-2020-00-OGPP/INEN elaborado por la Oficina de Organización y el Informe N° 787-2020-OPE-OGPP/INEN elaborado por la Oficina de Planeamiento Estratégico, mediante el cual emiten opinión favorable con respecto a proyecto de Procedimientos Normalizados de Trabajo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo, para la revisión y validación correspondiente;

Que, de la revisión efectuada del Documento Normativo en cuestión elaborado por el Equipo Funcional de Citometría de Flujo del Departamento de Patología, se aprecia que cumple con la estructura mínima señalada en la Directiva Administrativa N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la Elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas - INEN, aprobado mediante Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN, de fecha 10 de julio de 2019;

Que, en mérito al sustento técnico de la Oficina de Organización y del Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos, para la aprobación



del “Procedimientos Normalizados de Trabajo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo”, corresponde emitir el acto resolutivo correspondiente para su aprobación;

Contando con los vistos buenos de la Sub Jefatura Institucional, de la Gerencia General, de la Dirección de Control del Cáncer, del Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos, de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto y de la Oficina de Asesoría Jurídica;

Con las facultades conferidas en el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas - INEN, aprobado mediante Decreto Supremo N°001-2017-SA y la Resolución Suprema N°011-2018-SA;

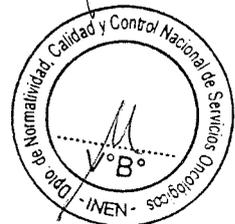
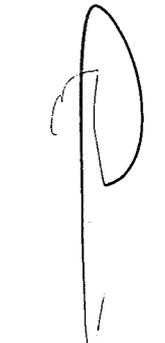
SE RESUELVE:

ARTÍCULO PRIMERO.- APROBAR el Procedimiento Normalizado de Trabajo siguiente, que en anexo forma parte integrante de la presente resolución.

- “Procedimientos Normalizados de Trabajo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo”.

ARTÍCULO SEGUNDO: Encargar a la Oficina de Comunicaciones la difusión de la Presente Resolución Jefatural, así como su publicación en la Página Web Institucional.

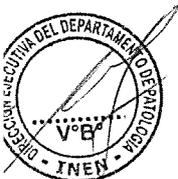
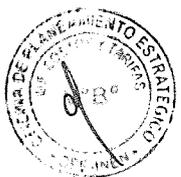
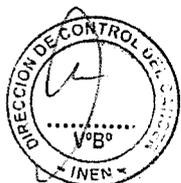
REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y PUBLÍQUESE.





PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO DEL EQUIPO FUNCIONAL DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo



| | | |
|---------------------------------|--|---|
| Elaborado por: | <ul style="list-style-type: none"> - M.C. Judith Vidal Ayllón - M.C. Daniela Dueñas Hanco - T.M. Julia Moya Naranjo | Equipo Funcional de Citometría de Flujo. Departamento de Patología. |
| Revisado y validado por: | <ul style="list-style-type: none"> - Lic. Angel Winston Riquez Quispe - Lic. Alexander Massa Villarto Pino Melliz | Oficina de Organización |
| | <ul style="list-style-type: none"> - Mg. Piyo Félix Celestino Lázaro - Lic. Angélica Mogollon Monteverde | Oficina de Planeamiento Estratégico Unidad Funcional de Costos y Tarifas |
| Revisado y aprobado por | <ul style="list-style-type: none"> - M.C. Odorico Iván Belzuarri Padilla - Lic. Yoseline Azarán Isla | Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos |

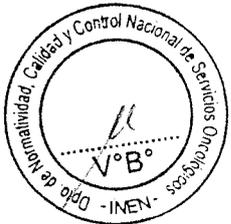
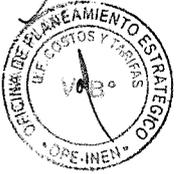
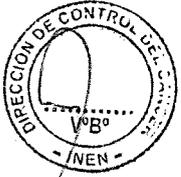
JUDITH VIDAL AYLLÓN
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas



CONTENIDO

- PNT.DNCC. INEN. 108. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LÍQUIDOS CORPORALES - V.01
- PNT.DNCC. INEN. 109. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA - V.01
- PNT.DNCC. INEN. 110. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN CITOMETRÍA DE ÍNDICE DE ADN PARA LLA B - V.01



JUDITH VIDAL AYLLÓN
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.108. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LÍQUIDOS CORPORALES - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología-
Equipo Funcional de Citometría de Flujo**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA
LÍQUIDOS CORPORALES****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Citometría de flujo para líquidos corporales.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS

- Código CPMS (MINSa): 88185.02
- Código Tarifario INEN: 210309

III. ALCANCE

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Citometría de flujo para líquidos corporales, y se aplica a todos los grupos de trabajo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo del Departamento de Patología, involucrados en el procesamiento de muestras para el estudio de diagnóstico y seguimiento de líquidos corporales.

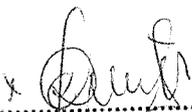
IV. RESPONSABILIDADES

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo: se encarga de supervisar el proceso y emitir los resultados de análisis.
- Biólogo/a, Tecnólogo/a Médico del Equipo Funcional de Citometría de Flujo: se encarga de realizar la recepción, marcaje, adquisición y pre-análisis de la muestra biológica.
- Personal Administrativo: se encarga de verificar la correspondencia de muestras y solicitudes de trabajo para el registro en el sistema administrativo hospitalario (SISINEN), ingreso de resultados a SISINEN, coordinaciones administrativas con las diferentes áreas usuarias.

V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Citometría de flujo:** Es una técnica que analiza simultáneamente y en corto tiempo, múltiples características de partículas que se preparan en una suspensión de medio líquido. Permite identificar, caracterizar, discriminar y cuantificar partículas en un medio que puede ser heterogéneo, con caracteres medidos en múltiples parámetros, basado en un sistema de adquisición partícula a partícula que son ordenadas para pasar en un mismo sentido a través de un haz de luz láser. ⁽¹⁾
- **Anticuerpos:** Son glucoproteínas capaces de reconocer moléculas específicas de una partícula, llamados antígenos. Forman parte del sistema inmune y son sintetizados por células B de la sangre en su estadio más maduro. Son utilizadas en el ámbito clínico tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de enfermedades de tipo infeccioso, inmunológico y neoplasias. ⁽²⁾



JUDITH VIDAL AYLLÓN

Jefa de Citometría de Flujo

CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.108. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LÍQUIDOS CORPORALES - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología-
Equipo Funcional de Citometría de Flujo

- **Anticuerpos monoclonales para citometría de flujo:** Son anticuerpos producidos por clones de células B y de mieloma llamados "hibridoma" que se unen al mismo epítipo de un antígeno proporcionando así datos altamente específicos.^(3,4)
- **Fluorocromos:** Son productos químicos que al ser estimulados con fotones con longitud de onda comprendida entre determinados rangos (de excitación) emiten a su vez otro fotón de longitud de onda mayor (de emisión). El prototipo es la fluoresceína que al ser estimulada con luz ultravioleta (no visible) emite luz de color verde (visible) aunque existen muchos otros como Ficoeritrina, Aloficocianina, V450, V500c, etc.^(3,4)
- **Líquido Cefalorraquídeo (LCR):** Es una solución compleja que se forma principalmente en los plexos coroideos y ventrículos laterales. Las tres cuartas partes se localizan en el espacio subaracnoideo y el resto en los ventrículos. En el adulto, el volumen total es variable, oscilando entre 90 y 150 mL. En el recién nacido, oscila entre 10 y 60 mL, pudiéndose duplicar en niños mayores. La obtención del LCR se realiza mediante una sencilla técnica que se denomina punción lumbar.⁽⁵⁾

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**Identificación por citometría de flujo de infiltración meningoencefálica, a través de la evaluación del líquido cefalorraquídeo, en pacientes con neoplasia hematológica y su asociación con parámetros clínico-biológicos de importancia pronóstica.⁽⁶⁾**VII. EQUIPAMIENTO****7.1 Equipos médico y biomédico:**

- 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 en stock
- Agitador de tubos o vórtex
- Reloj de tiempo con alarma
- Centrífuga de mesa con buckets para tubos de diferente tamaño
- Bomba de succión aspiración

7.2 Equipo electromecánico:

- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 36000 Btu Tipo Split.

7.3 Equipo informático:

- Computadora con monitor LCD de 18.5
- Impresora láser blanco y negro 35 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de etiquetas

7.4 Instrumental:

- Gradillas de polipropileno para 90 tubos de 13 x 100 mm
- Gradillas para los tubos solicitados
- Micropipeta de volumen variable 100 µL - 1000 µL
- Micropipeta de volumen variable 10 µL - 200 µL



J. Vidal
JUDITH VIDAL AYLLÓN
 Jefa de Citometría de Flujo
 GMP 14344 RNE. 14141
 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.108. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LÍQUIDOS CORPORALES - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología-
Equipo Funcional de Citometría de Flujo

- Micropipeta de volumen variable 0.5 µL - 10 µL

7.5 Mobiliario:

- Módulo de melamina
- Módulo de cómputo (otros)
- Silla giratoria de metal con brazos con espaldar media
- Taburete giratorio rodante

VIII. SUMINISTROS**8.1 Insumos y material médico:**

- 1 tubo plástico 3 mL al vacío con EDTA K2
- Punteras descartables de 100 µL – 1000 µL
- Punteras descartables de 10 µL – 200 µL
- Punteras descartables de 0.5 µL – 10 µL
- 3 tubos de poliestireno 12 x 75 mm de 5 mL, con tapa y anillo que calce en la aguja el citómetro
- Matraz de Erlenmayer
- Timer
- Frasco gotero de vidrio ámbar
- Formato de verificación de datos clínicos del paciente
- Cinta de cera para impresora

8.2 Bioseguridad:

- Lentes protectores de policarbonato
- Alcohol gel x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 4.73 L
- Detergente granulado industrial
- Gorro descartable unisex x 100 unidades
- Guante para examen descartable de nitrilo sin polvo talla M x 100 unidades
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lejía (hipoclorito de sodio) al 5%
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues

8.3 Reactivos:

- Solución estabilizadora de células sanguíneas (Transfix)
- Perla calibradora de citómetro de flujo 7 colores por 50 determinaciones
- Perla calibradora de citómetro de flujo 8 colores por 25 determinaciones
- Perla de perlas de 8 colores para ensayos oneflow para 5 pruebas por citometría

JUDITH VIDAL AYLLON
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.108. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LÍQUIDOS CORPORALES - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología-
Equipo Funcional de Citometría de Flujo

- Solución buffer para citometría de flujo
- Solución shut down para el citómetro de flujo
- Solución de limpieza para el citómetro de flujo (lavado interno del citómetro)
- Agua destilada estéril
- PBS (10 mm fosfato Na + K + 0.9% cloruro de sodio pH 7.4) con 0.5% albúmina bovina sérica
- Solución lisante glicodietileno y formaldehído

8.4 Anticuerpos:

- La lista de anticuerpos se presenta en el Anexo N° 1 y 2.

IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS**9.1 Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de equipamiento

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos

9.2 Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

MUESTRA**10.1 Obtención de la muestra:**

- Líquidos Corporales (LCR): El personal responsable de procedimientos del Equipo Funcional Procedimientos especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y al Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica, se encargan de hacer llegar la muestra hasta el área de recepción de muestra de Citometría de Flujo.
- Muestra tomada por personal de sala de operaciones (muestras de LCR).
- Recepción de muestras externas (referidos de otras instituciones).

10.2 Sistema biológico:

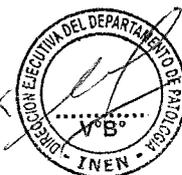
- Líquidos corporales (LCR).

10.3 Recipiente:

- Tubo con anticoagulante EDTA dipotásico con preservante celular (Transfix).

10.4 Conservación y manejo:

- Mantener en lugar libre de humedad y calor.
- Estabilidad:

**JUDITH VIDAL AYLLON**
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.108. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LÍQUIDOS CORPORALES - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología-
Equipo Funcional de Citometría de Flujo

- 4 días 26 - 37 °C
- 7 días 10 - 25 °C
- 10 días 4 - 8 °C

- En lo posible procesar la muestra luego de 18 horas de contacto de la muestra con el transfix.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Para la realización de este procedimiento se requieren las siguientes actividades:

11.1 Entrega de Material:

- 11.1.1 Semanalmente se entregan tubos con EDTA (con preservante celular - Transfix) a personal del Equipo Funcional Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y al Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.
- 11.1.2 Para pacientes de hospitales externos, se hará entrega del tubo y los formatos de solicitud de pruebas y de recolección de datos.

11.2 Recepción y revisión de la muestra correspondiente a la orden:

- 11.2.1 Verificar la correspondencia de muestras y orden.
- 11.2.2 Revisar condiciones de la muestra, tubo adecuado, cantidad de muestra adecuada ausencia de coágulos ni hemólisis.

11.3 Trillado de datos del paciente en SISINEN:

- 11.3.1 Búsqueda de resultados de diagnóstico del paciente en SISINEN por inmunofenotipo.

11.4 Codificación de la muestra y registro en el cuaderno de rutina:

- 11.4.1 Codificación numérica correlativa de la orden y el tubo de muestra, según registro del cuaderno de rutina del servicio.
- 11.4.2 Rotular con el código interno al tubo primario que contiene la muestra utilizando plumón indeleble.
- 11.4.3 Ingresar los datos al Sistema Administrativo Hospitalario (SISINEN), e imprimir etiqueta con código de barra.

11.5 Ingresar datos al SISINEN e impresión de etiqueta con código de barra:

- 11.5.1 Ingresar los datos registrados en la solicitud de análisis en el Sistema Administrativo Hospitalario (SISINEN).

11.6 Revisión de Historia Clínica:

- 11.6.1 Búsqueda de datos clínicos y exámenes auxiliares del paciente en SISINEN y/o Historia clínica.

11.7 Preparación del panel:

- 11.7.1 El personal Biólogo/a, Tecnólogo/a Médico a cargo deberá elegir el panel adecuado para responder la pregunta clínica de la solicitud, según la estandarización de paneles empleada en el área. (Ver Anexo N° 1 y 2).



x

JUDITH VIDAL AYLLON
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.108. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LÍQUIDOS CORPORALES - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología-
Equipo Funcional de Citometría de Flujo**11.8 Preparación del material para marcaje de la muestra:**

- 11.8.1 El personal Biólogo/a, Tecnólogo/a Médico a cargo debe prever el material que requiera para el marcaje (tubos, punteras, pipetas, reactivos, soluciones de trabajo y Buffer de lavado y adquisición).

11.9 Proceso de Marcaje:**11.9.1 Paso: Lavado de la muestra para marcaje de inmunoglobulinas**

- La muestra recibida debe estar en un tubo con EDTA (tubo lila) con 100 μ L de TRANSFIX.
- Homogenizar la muestra y colocarla en un tubo 12 x 75, luego enjuagar el tubo primario (EDTA) con 1mL de PBS+alb bov+ Az Na filtrado.
- Centrifugar a 540 g (2000 RPM) durante 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante (utilizando pipeta) con mucho cuidado y colocarlo en el tubo primario (EDTA) para refrigerar.
- Añadir 2 mL de PBS+alb bov+ Az Na filtrado y centrifugar a 540 g durante 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante con pipeta y dejar el pellet con un volumen residual de 50 μ L aproximadamente.
- Resuspender el pellet de células y añadir 150 μ L de PBS +alb bov+ Az Na filtrado.
- Homogenizar cuidadosamente, con vortex suave.

11.9.2 Paso: Marcaje e incubación de la muestra con anticuerpos de superficie

- Marcar el tubo 1 con el panel de screening de líquidos corporales con la mitad de la muestra.
- Si existe un estudio previo por citometría de flujo del paciente y/o se conoce el fenotipo de las células patológicas, hacer el segundo tubo específico para dicho paciente.
- Si el paciente no cuenta con estudios previos de inmunofenotipo, orientar el segundo tubo para el estudio de la línea celular alterada o sospechosa de alteraciones fenotípicas.
- Luego de agregar los anticuerpos, incubar 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

11.9.3 Paso: Fijar la muestra y lisar para eliminar hematíes

- Añadir 2 mL de solución de lisante e incubar 7 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

11.9.4 Paso: Centrifugar para eliminar lisante y solución

- Centrifugar a 540 g durante 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante (utilizando pipeta) con mucho cuidado.

11.9.5 Paso: Reconstitución para la adquisición

- Resuspender el pellet con 50 μ L de PBS filtrado para adquirir.
- Antes de adquirir el tubo revisar el estado del citómetro y limpiar el sistema de fluidos.



Judith Vidal Ayllon

JUDITH VIDAL AYLLON
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.108. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LÍQUIDOS CORPORALES - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología-
Equipo Funcional de Citometría de Flujo**11.9.6 Paso: Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo**

- a) Realizar un lavado del equipo previo a la adquisición de la muestra, debido a su baja celularidad. Para esto, adquirir un tubo con FACS CLEAN durante 5 minutos en HIGH.
- b) Hacer 3 veces clean flow cell con Facs clean.
- c) Adquirir un tubo con H2O_d limpia filtrada x 5min en HIGH. Revisar que no se observen eventos. Si se vieran más de 8 - 10 eventos/segundo, repetir el lavado desde CLEAN.
- d) Hacer 3 veces clean flow cell con H2O_d.
- e) Terminar el lavado colocando un tubo con PBS filtrado para 1 CLEAN FLOW CELL y adquirirlo x 1min en HIGH.
- f) Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4°C a 8°C durante 3 h, como máximo.
- g) Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Acquisition del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo.

**11.10 Análisis y elaboración del pre Informe:**

- 11.10.1 El personal administrativo elabora las plantillas en el programa power point de office y lo archiva en la carpeta específica, según el mes y año en curso ("Tubos 2020/Julio", por ejemplo), para la elaboración del pre-informe, a cargo del personal Biólogo/a, Tecnólogo/a Médico a cargo. El análisis se realiza utilizando el programa Infinicyt.
- 11.10.2 Durante la adquisición de las muestras se evalúa el marcaje adecuado, observando para ello las plantillas, histogramas o gráficas de puntos de cada fluorocromo en el software Facs Diva.
- 11.10.3 Los resultados obtenidos después de la adquisición serán evaluados por personal capacitado usando el software INFINICYT.
- 11.10.4 Elaborar el correspondiente Informe como archivo power point ppt.
- 11.10.5 Los resultados escritos en el power point se copian al sistema informático del INEN por el personal responsable para la visualización de este por parte del Médico tratante.

11.11 Análisis y elaboración del Informe final:

- 11.11.1 El análisis se realiza utilizando el programa Infinicyt, a cargo del Médico Patólogo encargado, quien revisa el pre-informe, verifica, modifica y autoriza el registro del informe final en SISINEN.

11.12 Registro en SISINEN:

- 11.12.1 El ingreso de los datos del informe final se lleva a cabo por el personal administrativo, utilizando usuario y contraseña respectiva del SISINEN.

11.13 Validación e Impresión de Informe:

- 11.13.1 A cargo del personal Médico Patólogo encargado. Requiere de Usuario y contraseña propio en SISINEN.



x Judith
JUDITH VIDAL AYLLON
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141
 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.108. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LÍQUIDOS CORPORALES - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología-
Equipo Funcional de Citometría de Flujo

11.13.2 Los resultados de los estudios deben interpretarse conjuntamente con la historia clínica del paciente, historial de pruebas en Citometría, así como los resultados de otros exámenes si fuera necesario.

11.13.3 Los informes copiados en el sistema informático SISINEN son validados por el personal Médico Patólogo responsable.

11.13.4 En el sistema SISINEN también se puede validar o corregir resultados discordantes.

**11.14 Entrega de informe y firma del paciente en el cuaderno del cargo:**

11.14.1 Los informes validados pueden ser visualizados por personal autorizado a través del SISINEN.

11.15 Registro de estadísticas por tipo de caso:

11.15.1 El personal administrativo registrará en archivos Excel la estadística de casos.

**11.16 Mantenimiento:**

11.16.1 Mantenimiento diario:

a) Consiste en los pasos de lavados matutinos y entre la adquisición de tubos para evitar interferencias y ruido de fondo en los archivos fcs.

b) Adicionalmente se utilizará una solución estándar con targets conocidos para la calibración de los equipos.

11.16.2 Mantenimiento semanal

a) Consiste en los pasos de lavados realizados 1 vez por semana para hacer limpieza profunda de celda, tubuladuras y jeringa de inyección de muestras.

**11.17 Compensación:**

11.17.1 Consiste en los pasos de puesta a punto del equipo para la estandarización empleada en el servicio (Euroflow), ajuste de voltajes y seguimiento de la estabilidad del sistema para el uso de estos niveles de voltajes.

11.17.2 Se realizará mensualmente, o en casos de cambio de lote del calibrador.

**XII. RESULTADOS ANALÍTICOS**

12.1 El informe del resultado es CUALITATIVO.

12.2 Los datos son reportados como "Negativo" si la población descrita no expresa el marcador evaluado.

12.3 Los datos son reportados como "Positivo" si la población descrita sí expresa el marcador evaluado, en un sistema de escala en cruces.

Para esto habrá 2 opciones

- Positivo débil (-/+), (+d)
- Positivo intenso (++); (+++)



Judith Vidal Ayllon
JUDITH VIDAL AYLLON
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141
 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



PNT.DNCC.INEN.108. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LÍQUIDOS CORPORALES - V.01

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología- Equipo Funcional de Citometría de Flujo

1. Sales M, Moraes-Vasconcelos D (Eds), Duarte A. Citometria de Fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa. São Paulo 2013.
2. Jaffe E, Arber D, Campo E et al. Hematopathology 2nd Edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2017. 11:231-232.
3. Van Dongen JJM, Orfao A, Lucio P et al. EuroFlow innovation and standardization of flow cytometric diagnosis and classification in hemato-oncology. Rotterdam 2012.
4. Glier H, Heijnen I, Hauwel M, et al. Standardization of 8-colorflow cytometry across differentflow cytometer instruments: A feasibility study in clinical laboratories in Switzerland. Journal of Immunological Methods 2017, In Press.
5. Montero R. Interpretación del líquido cefalorraquídeo. An Pediatr Contin. 2014; 12(1): 30-33.
6. Torres, X et al. Análisis de la utilidad de la citometría de flujo en la identificación de infiltración neoplásica del líquido cefalorraquídeo en pacientes con leucemia aguda y su asociación con parámetros clínico-biológicos de importancia pronóstica. Revista Colombiana de Cancerología, 21(1), 81.



XIV. ANEXOS

- Anexo N° 1: Panel de SCREENING 8 colores EUROFLOW PARA LCR: SST.
- Anexo N° 2: Tubo complementario orientado a sospecha diagnóstica.
- Anexo N° 3: Control de cambios y mejoras.



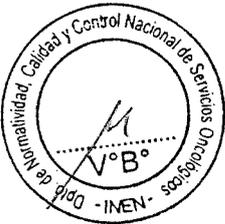
Judith Vidal Ayllon
JUDITH VIDAL AYLLON
 Jefa de Citometria de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141
 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas



PNT.DNCC.INEN.108. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LÍQUIDOS CORPORALES - V.01
 Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología- Equipo Funcional de Citometría de Flujo

ANEXO N° 1

PANEL DE SCREENING 8 COLORES EUROFLOW PARA LCR: SST



| Fluoresc | V450 | V500 | FITC | PE | PercPCy5.5 | PECy7 | APC | APCH7 |
|----------|------|------|------------------|------------------|------------|-------|-------------|-------|
| Ab | CD20 | CD45 | SlgLambda CD8 | SlgKappa CD56 | CD4 | CD19 | CD3 CD14 | CD38 |
| Vol. | 2ul | 2ul | 2ul (c/u) | 2ul (c/u) | 4ul | 2ul | 2ul | 2ul |

Judith Vidal Ayllon
JUDITH VIDAL AYLLON
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141
 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

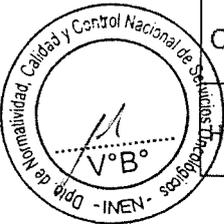
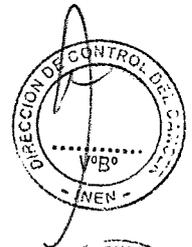


PNT.DNCC.INEN.108. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LÍQUIDOS CORPORALES - V.01
 Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología-
 Equipo Funcional de Citometría de Flujo

ANEXO N° 2

TUBO COMPLEMENTARIO ORIENTADO A SOSPECHA DIAGNÓSTICA

| V450 | V500 | FITC | PE | PercPCy5.5 | PECy7 | APC | APCH7 | SOSPECHA Dx | |
|--------|------|-------|-------|------------|--------|-------|-------------|---------------|--------|
| CD20 | CD45 | CD23 | CD10 | CD5 | CD19 | CD200 | CD3 CD14 | CP | LINF B |
| CD20 | CD45 | CD103 | CD95 | CD79b | CD19 | CD10 | CD3 CD14 | CG | |
| CD20 | CD45 | - | CD66c | CD34 | CD19 | CD10 | CD3 CD14 | LEUCEMIA B | |
| CD4 | CD45 | CD7 | CD56 | CD3 | CD2 | CD94 | CD8 CD14 | LINFOMA T/NK | |
| CD4 | CD45 | CD5 | CD25 | CD3 | CD45RO | CD14 | CD8 | LINFOMA T/ATL | |
| CyCD3 | CD45 | TdT | CD99 | CD5 | CD19 | CD7 | CD3/CD14 | LLAT | |
| HLA-DR | CD45 | CD13 | CD33 | CD34 | CD117 | CD11b | CD3 CD14 | LMA | |



Judith Vidal Ayllon

JUDITH VIDAL AYLLON
Jefa de Citometria de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas



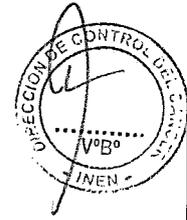
PNT.DNCC.INEN.108. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LÍQUIDOS CORPORALES - V.01

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología-
Equipo Funcional de Citometría de Flujo

ANEXO N° 3

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

| CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS | | | | |
|------------------------------|--------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| VERSIÓN | PÁGINA | DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA | FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN) | AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN) |
| 01 | 1 - 12 | Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN). | 11/08/2020 | M.C. Judith Vidal Ayllón |




JUDITH VIDAL AYLLÓN
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141
 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.109. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE HEMOGLOBINURIA
PAROXÍSTICA NOCTURNA****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Citometría de hemoglobinuria paroxística nocturna.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS

- Código CPMS (MINSa): 88185.01
- Código Tarifario INEN: 210307

III. ALCANCE

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Citometría de hemoglobinuria paroxística nocturna y se aplica a todos los grupos de trabajo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo del Departamento de Patología, involucrados en el procesamiento de muestras para el estudio de diagnóstico y seguimiento de Citometría de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN).

IV. RESPONSABILIDADES

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo: se encarga de supervisar el proceso y emitir los resultados de análisis.
- Biólogo/a, Tecnólogo/a Médico del Equipo Funcional de Citometría de Flujo: se encarga de realizar la recepción, marcaje, adquisición y pre-análisis de la muestra biológica.
- Personal Administrativo: se encarga de verificar la correspondencia de muestras y solicitudes de trabajo para el registro en el sistema administrativo hospitalario (SISINEN), ingreso de resultados a SISINEN, coordinaciones administrativas con las diferentes áreas usuarias.

V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Citometría de flujo:** Es una técnica que analiza simultáneamente y en corto tiempo, múltiples características de partículas que se preparan en una suspensión de medio líquido. Permite identificar, caracterizar, discriminar y cuantificar partículas en un medio que puede ser heterogéneo, con caracteres medidos en múltiples parámetros, basado en un sistema de adquisición partícula a partícula que son ordenadas para pasar en un mismo sentido a través de un haz de luz láser. ⁽¹⁾
- **Anticuerpos:** Son glucoproteínas capaces de reconocer moléculas específicas de una partícula, llamados antígenos. Forman parte del sistema inmune y son sintetizados por células B de la sangre en su estadio más maduro. Son utilizadas en el ámbito clínico tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de enfermedades de tipo infeccioso, inmunológico y neoplasias. ⁽²⁾

JUDITH VIDAL AYLLÓN
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141
 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.109. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

- **Anticuerpos monoclonales para citometría de flujo:** Son anticuerpos producidos por clones de células B y de mieloma llamados "hibridoma" que se unen al mismo epítipo de un antígeno proporcionando así datos altamente específicos. ^(3,4)
- **Fluorocromos:** Son productos químicos que al ser estimulados con fotones con longitud de onda comprendida entre determinados rangos (de excitación) emiten a su vez otro fotón de longitud de onda mayor (de emisión). El prototipo es la fluoresceína que al ser estimulada con luz ultravioleta (no visible) emite luz de color verde (visible) aunque existen muchos otros como Ficoeritrina, Alofocianina, V450, V500c, etc. ^(3,4)

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

La Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad clonal adquirida, causada por una mutación somática en el gen PIG-A. Este gen codifica una proteína involucrada en la síntesis del Glicosilfosfatidilinositol (GPI). La mutación ocurre en la célula precursora hematopoyética dando lugar a la deficiencia parcial o total de la proteína PIG-A con la consecuente alteración en la síntesis del GPI de anclaje. La HPN está caracterizada por anemia hemolítica crónica intravascular, hemoglobinuria, citopenias debido al fallo de la médula ósea, trombosis y raramente transformación leucémica. Se recomienda la citometría de flujo para confirmar la sospecha diagnóstica con seguimiento a los seis meses y posteriormente anual. ^(5,6,7)

**VII. EQUIPAMIENTO****7.1 Equipos médico y biomédico:**

- 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 en stock
- Refrigeradora eléctrica 4 °C para reactivos en uso
- Centrífuga de mesa con buckets para tubos de diferente tamaño
- Microscopio binocular
- Timer
- Agitador de tubos o vórtex
- Bomba de succión aspiración (con matraz Erlenmeyer de vidrio graduado 1L).

7.2 Equipo electromecánico:

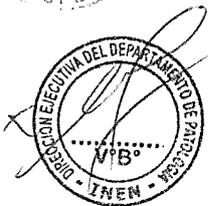
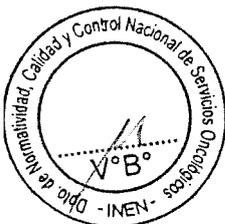
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 36000 Btu Tipo Split

7.3 Equipo informático:

- Computadora con monitor LCD de 18.5
- Equipo multifuncional copiadora impresora scanner de inyección a tinta color
- Impresora de código de barras térmica

7.4 Instrumental:

- Gradillas de polipropileno para 90 tubos de 13 x 100 mm
- Micropipeta de volumen variable 100 µL - 1000 µL
- Micropipeta de volumen variable 2 µL - 100 µL
- Micropipeta de volumen variable 0.5 µL - 10 µL



JUDITH VIDAL AYLLÓN
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.109. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

- Porta pipeta de polipropileno tipo carrusel para 7 pipetas
- Pipeta descartable Pasteur de vidrio
- Termómetro ambiental
- Frasco de vidrio graduado 1L con dispensador
- Piseta de polietileno de 250 µL

7.5 Mobiliario:

- Módulo de melamina
- Módulo de cómputo (otros)
- Silla giratoria de metal con brazos con espaldar media
- Taburete giratorio rodante

**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material médico:**

- Guantes de nitrilo descartables
- Lentes protectores de policarbonato
- 1 tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA K2
- Punteras descartables de 1000 µL
- Punteras descartables de 2 µL – 200 µL
- 2 tubos de poliestireno 12 x 75 mm de 5 mL, con tapa y anillo que calce en la aguja el citómetro

8.2 Bioseguridad:

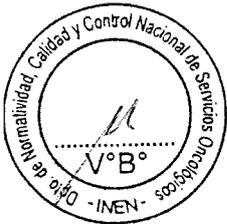
- Alcohol gel x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 4.73 L
- Detergente granulado industrial
- Gorro descartable unisex x 100 unidades
- Guante para examen descartable de nitrilo sin polvo talla M x 100 unidades
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lejía (hipoclorito de sodio) al 5%
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues

8.3 Reactivos:**a) Fluorocromos:**

- Ver Anticuerpos, fluorocromos con su respectivo título en anexo 1, según panel correspondiente.

b) Soluciones:

- Solución buffer PBS



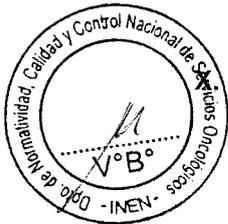
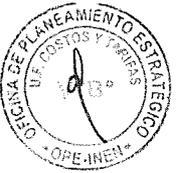
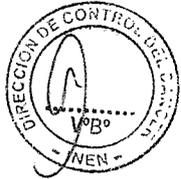
J. Vidal
JUDITH VIDAL AYLLON
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.109. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA - V.01**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

- Solución PBS + 0.09% de NaN₃(azida de sodio) + 0.5% BSA (Albúmina bovina sérica)
- Solución lisante FACS Lysing (diluido 1/10 en agua destilada)
- Solución tampón buffer para citometría de flujo
- Solución shutdown
- Solución de lavado para citómetro de flujo FACSCLEAN
- Solución para lavado contrad
- Agua destilada

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1 Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de equipamiento

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos

9.2 Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

MUESTRA**10.1 Obtención de la muestra:**

- Sangre periférica: es realizado por el área de trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica.
- Recepción de muestras externas (referidos de otras instituciones).

10.2 Sistema biológico:

- Sangre periférica.

10.3 Recipiente:

- Tubo con anticoagulante EDTA dipotásico.

10.4 Conservación y manejo:

- Mantener en lugar libre de humedad y calor.
- Estabilidad: 24 horas 15 - 25 °C.
- En lo posible procesar la muestra.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Para la realización de este procedimiento se requieren las siguientes actividades:

JUDITH VIDAL AYLLÓN
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.109. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo**11.1 Entrega de Material:**

11.1.1 Semanalmente se entregan tubos con EDTA al personal responsable de procedimientos del Equipo Funcional Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y al Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.

11.1.2 Para pacientes de hospitales externos, se hará entrega del tubo y los formatos de solicitud de pruebas y de recolección de datos.

11.2 Recepción y revisión de la muestra correspondiente a la orden:

11.2.1 Verificar la correspondencia de muestras y orden.

11.2.2 Revisar condiciones de la muestra, tubo adecuado, cantidad de muestra adecuada ausencia de coágulos ni hemólisis.

11.2.3 Ingresar los datos al Sistema Administrativo Hospitalario (SISINEN) e imprimir etiqueta con código de barra.

11.3 Trillado de datos del paciente en SISINEN:

11.3.1 Búsqueda de resultados de diagnóstico del paciente en SISINEN.

11.4 Codificación numérica de muestra y registro en el cuaderno de rutina:

11.4.1 Codificación numérica correlativa de la orden y el tubo de muestra, según registro del cuaderno de rutina del servicio.

11.4.2 Rotular con el código interno al tubo primario que contiene la muestra utilizando plumón indeleble.

11.5 Ingresar datos al SISINEN e impresión de etiqueta con código de barra:

11.5.1 Ingresar los datos del paciente al Sistema Administrativo Hospitalario (SISINEN), e imprimir etiqueta con código de barra.

11.6 Revisión de Historia Clínica:

11.6.1 Búsqueda de datos clínicos y exámenes auxiliares del paciente en SISINEN y/o Historia clínica.

11.7 **Recuento de la celularidad de la muestra:** Según instructivo de recuento celular aprobado por el Equipo Funcional de Citometría de Flujo.

11.8 **Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo para recuento de celularidad.**

11.9 **Preparación de panel para estudio de HPN:** (Ver Anexo N° 1).

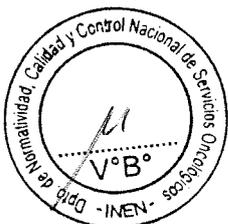
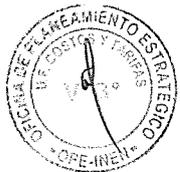
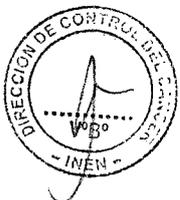
11.10 Preparación del material para marcaje de la muestra:

11.10.1 El personal Biólogo/a, Tecnólogo/a Médico a cargo debe prever el material que requiera para el marcaje (tubos, punteras, pipetas, reactivos, soluciones de trabajo y buffer de lavado y adquisición).

11.11 Marcaje e incubación de la muestra con anticuerpos:

11.11.1 En el tubo rotulado con el número de citometría de flujo correspondiente, colocar el volumen adecuado de marcadores dirigidos contra los antígenos de superficie celular.

11.11.2 Añadir el volumen adecuado de muestra, para la adquisición de 300 000 eventos totales (según recuento celular).



JUDITH VIDAL AYLLÓN
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.109. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

11.11.3 Si es necesario, utilice PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% para alcanzar un volumen final de 100 µl por tubo (ver información sobre los paneles Euro Flow).

11.11.4 Mezclar bien e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.

11.12 Fijar la muestra y lisar para eliminar hemáties:

11.12.1 Añadir 2 mL de 1x FACS Lysing Solution (10x FACS Lysing Solution diluido 1/10 vol / vol en agua destilada (H2O_d)).

11.12.2 Mezclar bien.

11.12.3 Incubar durante 10 min a temperatura ambiente protegido de la luz.

11.13 Centrifugado para eliminar lisante y lavado de la muestra:

11.13.1 Centrifugar durante 5 min a 540 g.

11.13.2 Descarte el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar el sedimento celular, dejando aproximadamente 50 µl de volumen residual en cada tubo.

11.13.3 Añadir 2 ml de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular

11.13.4 Mezclar bien.

11.13.5 Centrifugar durante 5 min a 540 g.

11.13.6 Descarte el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar el sedimento celular, dejando aproximadamente 50 µl de volumen residual en cada tubo.

11.14 Reconstitución para la adquisición:

11.14.1 Resuspender el sedimento celular en 200ul de PBS + BSA al 0,2%.

11.15 Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo:

11.15.1 Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4°C a 8°C durante 1 h, como máximo.

11.15.2 Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisición del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo.

11.15.3 Durante la adquisición de las se evalúa el marcaje adecuado, observando para ello las plantillas, histogramas o gráficas de puntos de cada fluorocromo en el software Facs Diva.

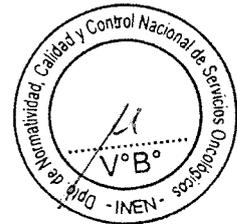
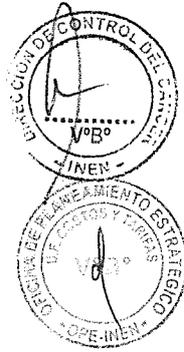
11.16 Análisis y Elaboración del pre-informe:

11.16.1 El personal administrativo elabora las plantillas en el programa power point de office y lo archiva en la carpeta específica, según el mes y año en curso ("Tubos 2020/Julio", por ejemplo), para la elaboración del pre-informe, a cargo del personal Biólogo/a, Tecnólogo/a Médico a cargo. El análisis se realiza utilizando el programa Infinicyt.

11.16.2 El informe del resultado es cualitativo.

11.16.3 Los resultados obtenidos después de la adquisición serán evaluados por personal capacitado usando el software INFINICYT.

11.16.4 Elaborar el correspondiente Informe como archivo power point ppt.



JUDITH VIDAL AYLLÓN
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.109. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

11.16.5 Los resultados escritos en el power point se transcribe al sistema informático del INEN por el personal responsable para la visualización de este por parte del médico tratante.

11.17 Análisis y Elaboración del informe final:

11.17.1 El análisis se realiza utilizando el programa Infinicyt, a cargo del médico patólogo encargado, quien revisa el pre-informe, verifica, modifica y autoriza el registro del informe final en SISINEN.

11.18 Registro en SISINEN:

11.18.1 El ingreso de los datos del informe final se lleva a cabo por el personal administrativo, utilizando usuario y contraseña respectiva del SISINEN.

11.19 Validación e impresión de informe:

11.19.1 A cargo del personal Médico Patólogo encargado. Requiere de Usuario y contraseña propio en SISINEN.

11.19.2 Los resultados de los estudios deben interpretarse conjuntamente con la historia clínica del paciente, historial de pruebas en citometría, así como los resultados de otros exámenes si fuera necesario.

11.19.3 Los informes copiados en el sistema informático SISINEN son validados por el personal médico responsable.

11.19.4 En el sistema SISINEN también se puede validar o corregir resultados discordantes.

11.20 Entrega de informe y firma del paciente en cuaderno de cargo:

11.20.1 Los informes validados pueden ser visualizados por personal autorizado a través del SISINEN.

11.21 Registro de estadísticas por tipo de caso:

11.21.1 El personal administrativo registra en archivos excel la estadística de casos.

11.22 Mantenimiento:

11.22.1 Mantenimiento diario:

a) Consiste en los pasos de lavados matutinos y entre la adquisición de tubos para evitar interferencias y ruido de fondo en los archivos fcs.

b) Adicionalmente se utilizará una solución estándar con targets conocidos para la calibración de los equipos.

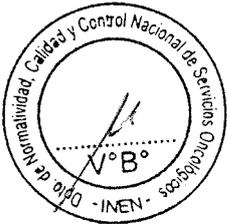
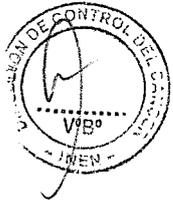
11.22.2 Mantenimiento semanal:

a) Consiste en los pasos de lavados realizados 1 vez por semana para hacer limpieza profunda de celda, tubuladuras y jeringa de inyección de muestras.

11.23 Compensación:

11.23.1 Consiste en los pasos de puesta a punto del equipo para la estandarización empleada en el servicio (Euroflow), ajuste de voltajes y seguimiento de la estabilidad del sistema para el uso de estos niveles de voltajes.

11.23.2 Se realiza mensualmente, o en casos de cambio de lote del calibrador.



JUDITH VIDAL AYLLON
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.109. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo**XII. RESULTADOS ANALÍTICOS**

- 12.1 El informe del resultado es cualitativo.
- 12.2 Los datos son reportados como "Negativo" si la población descrita no expresa el marcador evaluado.
- 12.3 Los datos son reportados como "Positivo" si la población descrita sí expresa el marcador evaluado, en un sistema de escala en cruces

Para esto habrá 2 opciones:

- Positivo débil (-/+), (+d)
- Positivo intenso (++) ; (+++)

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sales M, Moraes-Vasconcelos D (Eds), Duarte A. Citometria de Fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa. São Paulo 2013.
2. Jaffe E, Arber D, Campo E et al. Hematopathology 2nd Edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2017. 11:231-232.
3. Van Dongen JJM, Orfao A, Lucio P et al. EuroFlow innovation and standardization of flow cytometric diagnosis and classification in hemato-oncology. Rotterdam 2012.
4. Glier H, Heijnen I, Hauwel M, et al. Standardization of 8-colorflow cytometry across differentflow cytometer instruments: A feasibility study in clinical laboratories in Switzerland. Journal of Immunological Methods 2017, In Press.
5. Parker C, Omine M, Richards S, et al. International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 2005; 106: 3699-3709.
6. Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Curr Opin Hematol. 2012; 19:141-148.
7. Mannelli F, Bencini S, Peruzzi B, et al. A systematic analysis of bone marrow cells by flow cytometry defines a specific phenotypic profile beyond GPI deficiency in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Cytometry B Clin Cytom. 2013; 84:71-81.

XIV. ANEXOS

- Anexo N° 1: Panel de anticuerpos para HPN.
- Anexo N° 2: Control de cambios y mejoras.


JUDITH VIDAL AYLLON
 Jefa de Citometria de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas



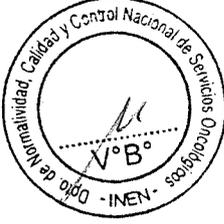
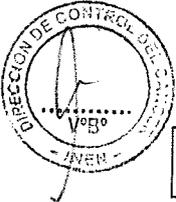
PNT.DNCC.INEN.109. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA - V.01

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

ANEXO N° 1

PANEL DE ANTICUERPOS PARA HPN

| | V450 | V500c | FITC | PE | PERCP Cy5.5 | PE-Cy7 | APC | APC-H7 |
|---------|------|-------|-----------|------------|-------------|--------|------|--------|
| Tubo 1 | CD16 | CD45 | FLAER | CD157 | CD33 | CD10 | CD64 | CD14 |
| Vol Rvo | 3 | 5 | 5 | 5 | 10 | 5 | 5 | 5 |
| Marca | BD | BD | Cedarlane | Invitrogen | BD | BD | BD | BD |



JUDITH VIDAL AYLLÓN
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas



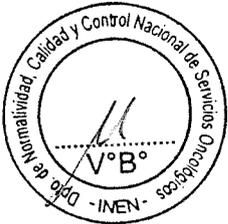
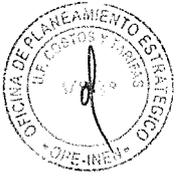
PNT.DNCC.INEN.109. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA - V.01

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

ANEXO N° 2

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

| CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS | | | | |
|------------------------------|--------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| VERSIÓN | PÁGINA | DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA | FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN) | AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN) |
| 01 | 1 - 10 | Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN). | 11/08/2020 | M.C. Judith Vidal Ayllón |



Judith Vidal Ayllón
JUDITH VIDAL AYLLÓN
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141
 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.110. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE ÍNDICE DE ADN PARA LLA B - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE ÍNDICE DE ADN
PARA LLA B****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Citometría de índice de ADN para LLA B.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS

- Código CPMS (MINSa): 88182.01
- Código Tarifario INEN: 210308

III. ALCANCE

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Citometría de índice de ADN para LLA B y aplica a todos los grupos de trabajo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo del Departamento de Patología, involucrados en el procesamiento de muestras para el estudio de diagnóstico y seguimiento de índice de ADN para LLA B.

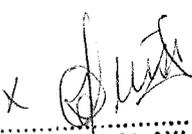
IV. RESPONSABILIDADES

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo: se encarga de supervisar el proceso y emitir los resultados de análisis.
- Biólogo/a, Tecnólogo/a Médico del Equipo Funcional de Citometría de Flujo: se encarga de realizar la recepción, marcaje, adquisición y pre-análisis de la muestra biológica.
- Personal Administrativo: se encarga de verificar la correspondencia de muestras y solicitudes de trabajo para el registro en el sistema administrativo hospitalario (SISINEN), ingreso de resultados a SISINEN, coordinaciones administrativas con las diferentes áreas usuarias.

V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Citometría de flujo:** Es una técnica que analiza simultáneamente y en corto tiempo, múltiples características de partículas que se preparan en una suspensión de medio líquido. Permite identificar, caracterizar, discriminar y cuantificar partículas en un medio que puede ser heterogéneo, con caracteres medidos en múltiples parámetros, basado en un sistema de adquisición partícula a partícula que son ordenadas para pasar en un mismo sentido a través de un haz de luz láser. ⁽¹⁾
- **Anticuerpos:** Son glucoproteínas capaces de reconocer moléculas específicas de una partícula, llamados antígenos. Forman parte del sistema inmune y son sintetizados por células B de la sangre en su estadio más maduro. Son utilizadas en el ámbito clínico tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de enfermedades de tipo infeccioso, inmunológico y neoplasias. ⁽²⁾



JUDITH VIDAL AYLLON
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141

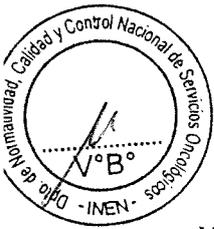
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.110. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE ÍNDICE DE ADN PARA LLA B - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

- **Anticuerpos monoclonales para citometría de flujo:** Son anticuerpos producidos por clones de células B y de mieloma llamados "hibridoma" que se unen al mismo epítipo de un antígeno proporcionando así datos altamente específicos. ^(3,4)
- **Fluorocromos:** Son productos químicos que al ser estimulados con fotones con longitud de onda comprendida entre determinados rangos (de excitación) emiten a su vez otro fotón de longitud de onda mayor (de emisión). El prototipo es la fluoresceína que al ser estimulada con luz ultravioleta (no visible) emite luz de color verde (visible) aunque existen muchos otros como Ficoeritrina, Aloficocianina, V450, V500c, etc. ^(3,4)
- **Leucemia linfoblástica aguda B (LLA B):** Las leucemias linfoblásticas con anomalías genéticas recurrentes son un grupo de enfermedades que incluyen translocaciones balanceadas y anomalías que involucran el número cromosómico, cada subgrupo tiene importantes implicancias pronósticas debido a que son biológicamente distintos. Las LLA B hiperdiploides es común en niños, son cerca del 25% de todos los casos de LLA B, tienen pronóstico favorable con cura >90% en niños. La LLA B hipodiploide alcanza cerca del 5% de todos los casos con LLA, tiene pobre pronóstico. ⁽⁵⁾

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Las aneuploidías pueden ser detectadas con cariotipo convencional, FISH o citometría de flujo. ⁽⁶⁾ Usando la técnica de citometría podemos determinar el contenido de ADN de células teñidas con yoduro de propidio, correlacionándose con el número de cromosomas que poseen. El índice de ADN (IADN) es la relación del contenido de ADN de células leucémicas entre células normales ambos en fase G0/G1 ⁽⁷⁾. El IADN entre 0.95-1.05 corresponde a 46 cromosomas (diploidía), IADN < 0.95 a un número de cromosomas menor a 46 (hipodiploidía) e IADN > 1.05 a valores mayores de 46 cromosomas (hiperdiploidía). La cuantificación del ADN proporciona información clínica relevante para el pronóstico, la evaluación y el seguimiento de pacientes con tumores sólidos o neoplasias malignas hematológicas. La precisión en la medición del IADN en leucemias linfoblásticas agudas es importante para la estratificación del tratamiento: hiperdiploidías con IADN ≥ 1.16 es predictivo de pronóstico favorable, mientras que la hipodiploidía está asociada a peor pronóstico. ⁽⁸⁾

**VII. EQUIPAMIENTO****7.1 Equipos médico y biomédico:**

- Citómetro de Flujo FACS Canto II de 8 colores: V450, V500, FITC, PE, PerCP Cy5.5, PE Cy7, APC y APC-H7
- 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 en stock
- Refrigeradora eléctrica 4 °C para reactivos en uso
- Agitador de tubos o vórtex
- Reloj de tiempo con alarma
- Centrífuga de mesa con buckets para tubos de diferente tamaño
- Bomba de succión aspiración (con matraz Erlenmeyer de vidrio graduado 1L)

7.2 Equipo electromecánico:

- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 36000 Btu Tipo Split

JUDITH VIDAL AYLLÓN
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.110. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE ÍNDICE DE ADN PARA LLA B - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo**7.3 Equipo informático:**

- Computadora con monitor LCD de 18.5
- Equipo multifuncional copiadora impresora scanner de inyección a tinta color
- Impresora de código de barras térmica

7.4 Instrumental:

- Gradillas de polipropileno para 90 tubos de 13 x 100 mm
- Micropipeta de volumen variable 100 µL - 1000 µL
- Micropipeta de volumen variable 10 µL - 100 µL
- Micropipeta de volumen variable 0.5 µL - 10 µL
- Porta pipeta de polipropileno tipo carrusel para 7 pipetas
- Pipeta descartable Pasteur de vidrio
- Termómetro ambiental
- Frasco de vidrio graduado 1L con dispensador

7.5 Mobiliario:

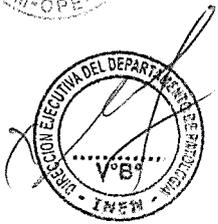
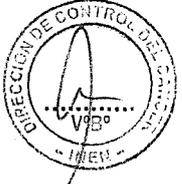
- Módulo de melamina
- Módulo de cómputo (otros)
- Silla giratoria de metal con brazos con espaldar media
- Taburete giratorio rodante

VIII. SUMINISTROS**8.1 Insumos y material médico:**

- Guantes de nitrilo descartables
- Lentes protectores de policarbonato
- 1 tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA K2
- Punteras descartables de 1000 µL
- Punteras descartables de 2 µL - 200 µL
- 2 tubos de poliestireno 12 x 75 mm de 5 mL, con tapa y anillo que calce en la aguja el citómetro

8.2 Bioseguridad:

- Alcohol gel x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 4.73 L
- Detergente granulado industrial
- Gorro descartable unisex x 100 unidades
- Guante para examen descartable de nitrilo sin polvo talla M x 100 unidades
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL



Judith Vidal Ayllón
 JUDITH VIDAL AYLLÓN
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141
 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.110. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE ÍNDICE DE ADN PARA LLA B - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

- Lejía (hipoclorito de sodio) al 5%
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues

8.3 Reactivos:**a) Fluorocromos:**

- Kit de ADN para Leucemia Linfoblástica Aguda B (LLA B):
 - o Anticuerpo primario CD19/CD22/CD20/CD10
 - o Anticuerpo secundario IgG FITC
 - o Solución lisante de eritrocitos basada en cloruro de amonio
 - o Solución de marcaje de ADN conteniendo yoduro de propidio
- Perla calibradora de citómetro de flujo 7 colores por 50 det
- Perla calibradora de citómetro de flujo 8 colores por 25 det
- Solución buffer para citometría de flujo
- Solución shut down para el citómetro de flujo
- Solución de lavado para el citómetro de flujo
- Agua destilada estéril
- PBS (10 mM fosfato Na + K + 0.9% cloruro de sodio pH 7.4) con 0.5% albúmina bovina sérica

b) Soluciones:

- Solución buffer PBS
- Solución PBS + 0.09% de NaN₃(azida de sodio) + 0.5% BSA (Albúmina bovina sérica)
- Solución tampón buffer para citometría de flujo
- Solución shutdown
- Solución de lavado para citómetro de flujo FACSCLEAN
- Solución para lavado contrad

IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS**9.1 Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de equipamiento

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos

9.2 Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

JUDITH VIDAL AYLLON
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.110. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE ÍNDICE DE ADN PARA LLA B - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo**X. MUESTRA****10.1 Obtención de la muestra:**

- Médula ósea: El personal responsable de procedimientos del Equipo Funcional Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica, se encargan de hacer llegar la muestra hasta el área de recepción de muestra de Citometría de Flujo.
- Sangre periférica: es realizado por el área de trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica.
- Recepción de muestras externas (referidos de otras instituciones).

10.2 Sistema biológico:

- Médula ósea o sangre periférica.

10.3 Recipiente:

- Tubo con anticoagulante EDTA dipotásico.

10.4 Conservación y manejo:

- Mantener en lugar libre de humedad y calor.
- Estabilidad: 24 horas 15 - 25 °C.
- En lo posible procesar la muestra.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Para la realización de este procedimiento se requieren las siguientes actividades:

11.1 Entrega de Material:

- 11.1.1 Semanalmente se entregan tubos con EDTA al personal responsable de procedimientos del Equipo Funcional Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y al Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.
- 11.1.2 Para pacientes de hospitales externos, se hará entrega del tubo y los formatos de solicitud de pruebas y de recolección de datos.

11.2 Recepción de la muestra:

- 11.2.1 Verificar la correspondencia de muestras y orden.
- 11.2.2 Revisar condiciones de la muestra, tubo adecuado, cantidad de muestra adecuada ausencia de coágulos ni hemólisis.

11.3 Registro de la muestra:

- 11.3.1 Codificación numérica correlativa de la orden y el tubo de muestra, según registro del cuaderno de rutina del servicio.
- 11.3.2 Rotular con el código interno al tubo primario que contiene la muestra utilizando plumón indeleble.
- 11.3.3 Ingresar los datos al Sistema Administrativo Hospitalario (SISINEN), e imprimir etiqueta con código de barra.


JUDITH VIDAL AYLLON
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.110. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE ÍNDICE DE ADN PARA LLA B - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo**11.4 Trillado de datos del paciente en SISINEN:**

11.4.1 Búsqueda de resultados de diagnóstico del paciente en SISINEN.

11.5 Revisión de historia clínica:

11.5.1 Búsqueda de datos clínicos y exámenes auxiliares del paciente en SISINEN y/o Historia clínica.

11.6 Preparación del material para marcaje de la muestra:

11.6.1 El personal Biólogo/a, Tecnólogo/a Médico a cargo debe prever el material que requiera para el marcaje (tubos, punteras, pipetas, reactivos, soluciones de trabajo y Buffer de lavado y adquisición).

11.7 Marcaje de ADN:

- 11.7.1 Pipetear 100 µL o más de muestra (considerar la celularidad).
- 11.7.2 Agregar 40 µL de anticuerpo primario (CD19/CD10/CD20/CD22).
- 11.7.3 Realizar vortéx de la muestra e incubarla 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 11.7.4 Adicionar 2 mL de PBS, centrifugar 5 min a 540 g. Eliminar sobrenadante.
- 11.7.5 Agregar 20 µL de anticuerpo secundario (IgG FITC), vórtex e incubar 10 minutos.
- 11.7.6 Adicionar 2 mL de PBS, centrifugar 5 min a 540 g. Eliminar sobrenadante.
- 11.7.7 Adicionar 2 mL de solución lisante del Kit, incubar 10 minutos.
- 11.7.8 Centrifugar 5 min a 540g. Eliminar el sobrenadante y restos de lisante sobre papel filtro.
- 11.7.9 Añadir 1ml de marcaje de ADN - Ioduro de Propidio – (IP), incubar 10 min y luego proceder inmediatamente a la lectura.
- 11.7.10 Adquirir la muestra en Low, 50000 eventos totales.
- 11.7.11 Preparar 1 tubo con sangre lisada para la limpieza del citómetro luego de adquirir las muestras, para eliminar restos de Ioduro de Propidio.

11.8 Lavado de la muestra:

11.8.1 Corresponde a los lavados en los pasos 11.7.4 y 11.7.6 con solución salina para sheat fluid (que contiene EDTA), por centrifugación.

11.9 Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo:

11.9.1 Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisición del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo.

11.10 Análisis y elaboración del pre informe:

11.10.1 El personal administrativo elabora las plantillas en el programa power point de office y lo archiva en la carpeta específica, según el mes y año en curso ("Tubos 2020/Julio", por ejemplo), para la elaboración del pre-informe, a cargo del personal Biólogo/a, Tecnólogo/a Médico a cargo. El análisis se realiza utilizando el programa Infinicyt.

11.10.2 El informe del resultado es cualitativo.




JUDITH VIDAL AYLLÓN
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.110. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE ÍNDICE DE ADN PARA LLA B - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

- 11.10.3 Durante la adquisición de las muestras se evalúa el marcaje adecuado, observando para ello las plantillas, histogramas o gráficas de puntos de cada fluorocromo en el software Facs Diva.
- 11.10.4 Los resultados obtenidos después de la adquisición serán evaluados por personal capacitado usando el software INFINICYT.
- 11.10.5 Elaborar el correspondiente Informe como archivo power point ppt.
- 11.10.6 Los resultados escritos en el power point se copian al sistema informático del INEN por el personal responsable para la visualización de este por parte del Médico tratante.

11.11 Análisis y elaboración del informe final:

- 11.11.1 El análisis se realiza utilizando el programa Infinicyt, a cargo del Médico Patólogo encargado, quien revisa el pre-informe, verifica, modifica y autoriza el registro del informe final en SISINEN.

11.12 Registro en SISINEN:

- 11.12.1 El ingreso de los datos del informe final se lleva a cabo por el personal administrativo, utilizando usuario y contraseña respectiva del SISINEN.

11.13 Validación e impresión de informe:

- 11.13.1 A cargo del personal Médico Patólogo encargado. Requiere de Usuario y contraseña propio en SISINEN.
- 11.13.2 Los resultados de los estudios deben interpretarse conjuntamente con la historia clínica del paciente, historial de pruebas en Citometría, así como los resultados de otros exámenes si fuera necesario.
- 11.13.3 Los informes copiados en el sistema informático SISINEN son validados por el personal Médico Patólogo responsable.
- 11.13.4 En el sistema SISINEN también se puede validar o corregir resultados discordantes.

11.14 Entrega de informe y firma del paciente en el cuaderno del cargo:

- 11.14.1 Los informes validados pueden ser visualizados por personal autorizado a través del SISINEN.

11.15 Registro de estadísticas por tipo de caso:

- 11.15.1 El personal administrativo registra en archivos excel la estadística de casos.

XII. RESULTADOS ANALÍTICOS**12.1 Rangos de valores a informar: valor numérico:**

Valores de referencia:

- 0.95 – 1.05 diploidía.
- < 0.95 hipodiploidía.
- > 1.05 hiperdiploidía.

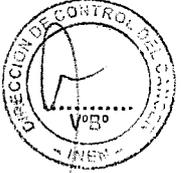
12.2 Rangos de alarma: No aplica.

JUDITH VIDAL AYLLÓN
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

**PNT.DNCC.INEN.110. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
CITOMETRÍA DE ÍNDICE DE ADN PARA LLA B - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo**XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Sales M, Moraes-Vasconcelos D (Eds), Duarte A. Citometría de Flujo: aplicaciones no laboratório clínico e de pesquisa. Saõ Paulo 2013.
2. Jaffe E, Arber D, Campo E et al. Hematopathology 2nd Edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2017. 11:231-232.
3. Van Dongen JJM, Orfao A, Lucio P et al. EuroFlow innovation and standardization of flow cytometric diagnosis and classification in hemato-oncology. Rotterdam 2012.
4. Glier H, Heijnen I, Hauwel M, et al. Standardization of 8-colorflow cytometry across differentflow cytometer instruments: A feasibility study in clinical laboratories in Switzerland. Journal of Immunological Methods 2017.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (Eds). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition). IARC: Lyon 2017.
6. Martin PL, Look AT, Schnell S, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization, cytogenetic analysis, and DNA index analysis to detect chromosomes 4 and 10 aneuploidy in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. J Pediatr Hematol Oncol. 1996; 18:113-121.
7. Rachieru-Sourisseau P, Baranger L, Dastugue N, Robert A, Geneviève F, Kuhlein EChassevent A. DNA Index in childhood acute lymphoblastic leukemia: a karyotypic method to validate the flow cytometric measurement. International Journal Laboratory Hematology. 2010;32: 288-298.
8. Look AT, Roberson PK, Williams DL, Rivera G, Bowman WP, Pui CH, Ochs J, Abromowitch M, Kalwinsky D, Dahl GV. Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1985;65(5):1079-1086.
9. Bassan R, Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 2011; 29:532-543.

**XIV. ANEXOS**

- Anexo N° 1: Panel de anticuerpos para ADN LLA B.
- Anexo N° 2: Modelo de Informe interno.
- Anexo N° 3: Control de cambios y mejoras.



JUDITH VIDAL AYLLÓN
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas



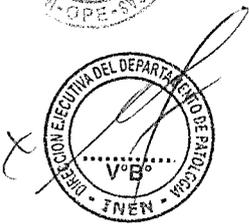
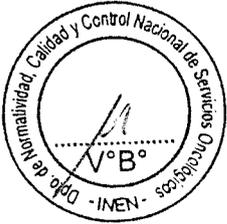
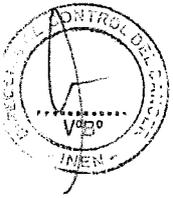
PNT.DNCC.INEN.110. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE ÍNDICE DE ADN PARA LLA B - V.01

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

ANEXO N° 1

PANEL DE ANTICUERPOS PARA ADN - LLA B

| | |
|------------------------------|--------------------------|
| Reactivos para selección | CD19/CD10/CD20/CD22 FITC |
| Reactivo para tinción de AND | Ioduro de propidio |



J. Vidal Ayllon
JUDITH VIDAL AYLLON
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141
 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas



PERÚ

Sector Salud

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

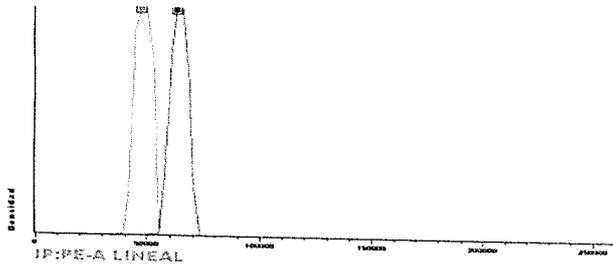
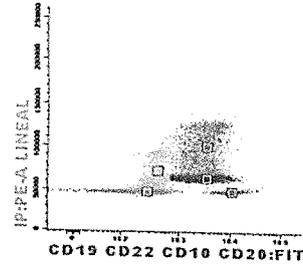
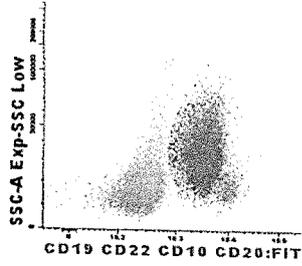
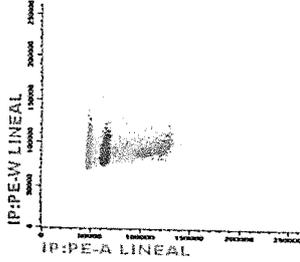
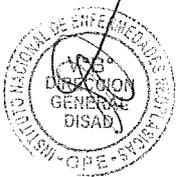


PNT.DNCC.INEN.110. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE ÍNDICE DE ADN PARA LLA B - V.01

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

ANEXO N° 2

MODELO DE INFORME INTERNO



| CELULAS VIABLES | |
|-----------------|----------------------------|
| ● | Otros CELULAS VIABLES |
| ● | BLASTO B PATOLOGICO G0/G1 |
| ● | BLASTO B PATOLOGICO S+G2+M |
| ● | CEL NORMAL G0/G1 |
| ● | CEL NORMAL S+G2+M |
| ● | B No QNH |

Judith Vidal Ayllon
JUDITH VIDAL AYLLON
 Jefa de Citometría de Flujo
 CMP 14344 RNE. 14141
 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas



PNT.DNCC.INEN.110. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE ÍNDICE DE ADN PARA LLA B - V.01

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

ANEXO N° 3

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

| CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS | | | | |
|------------------------------|--------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| VERSIÓN | PÁGINA | DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA | FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN) | AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN) |
| 01 | 1 - 11 | Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN). | 11/08/2020 | M.C. Judith Vidal Ayllón |



JUDITH VIDAL AYLLÓN
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas