### REPUBLICA DEL PERU



#### **RESOLUCION JEFATURAL**

Surquillo, 22 de SETIEM BREde 2020

VISTOS:

El Informe N° 229-2020-DNCC-DICON/INEN emitido por el Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos, el Memorando N° 931-2020-OGPP/INEN, de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto, el Informe N° 291-2020-DICON/INEN, de la Dirección de Control del Cáncer y el Informe N° 674-2020-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, con fecha 11 de enero del 2007, se aprobó el Reglamento de Organización y Funciones – ROF, del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas – INEN, estableciendo la jurisdicción, funciones generales y estructura orgánica del Instituto, así como las funciones de sus diferentes órganos y unidades orgánicas:

Que mediante 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, se estableció en su numeral 6.6, el procedimiento de revisión de los de Procedimientos Normalizados de Trabajo en el INEN;

Que, a través del Informe N° 229-2020-DNCC-DICON/INEN, de fecha 27 de agosto de 2020, emitido por el Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos, concluye que los 05 Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) elaborados por el Equipo Funcional de Citometría de Flujo, en el marco de sus competencias, de conducción coordinación y asesoría en la formulación/actualización de documentos normativos en el INEN, ha completado la revisión, asistencia técnica y validación de 05 Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) elaborados por el Equipo Funcional de Citometría de Flujo, el cual se encuentra conforme;

Que mediante Informe N° 150-2020-OO-OGPP/INEN, de fecha 03 de setiembre del 2020, elaborado por la Oficina de Organización, emite opinión técnica favorable, en relación a 05 Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) elaborados por el Equipo Funcional de Citometría de Flujo, indicando que no colisiona con la estructura orgánica o funcional de la

Entidad;

JUDITH VIDAL AYLLON
Jefa de Citometria de Flujo
CMP 14344 RNE

Jefa de Citometria de Flujo CMP 14344 RNE. 14141 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplasicas



DIRECTON

DISAD

Que, mediante del Informe N° 863-2020-OPE-OGPP/INEN de fecha 04 de setiembre de 2020, la Oficina de Planeamiento Estratégico, emite opinión favorable a los 05 Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) elaborados por el Equipo Funcional de Citometría de Flujo, las mismas que se sujetan a la estructura de costos en cuanto a la identificación del CPMS, equipamiento y Suministro;

Que a través del Informe N° 291-2020-DICON/INEN, de fecha 10 de setiembre de 2020, emitido por la Dirección de Control del Cáncer, procede a elevar para su aprobación 05 Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) elaborados por el Equipo Funcional de Citometría de Flujo;

Que, con Informe de vistos, la Oficina de Asesoría Jurídica opina que resulta viable la aprobación de 05 Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) elaborados por el Equipo Funcional de Citometría de Flujo;

Contando con los vistos buenos de la Sub Jefatura Institucional, la Gerencia General, la Oficina de Organización, la Oficina de Planeamiento Estratégico, el Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos, la Dirección de Control Cáncer, de la Jefa de Citometría de Flujo, del Departamento de Patología, la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento y de la Oficina de Asesoría Jurídica del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas-INEN;

En uso de las atribuciones y facultades conferidas en el Decreto Supremo N° 001-2007-SA, que aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas - INEN y la Resolución Suprema N° 011-2018-SA;



#### SE RESUELVE:

ARTÍCULO PRIMERO. – APROBAR cinco (05) Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) elaborados por el Equipo Funcional de Citometría de Flujo que como anexo forman parte integrante de la presente Resolución.

**ARTÍCULO SEGUNDO. - ENCARGAR** a la Oficina de Comunicaciones, la difusión de la presente resolución, así como su publicación en la página web institucional.

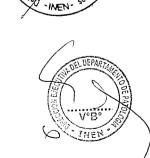
REGISTRESE, COMUNIQUESE Y PUBLÍQUESE.

ENFERME,

OF DIAGON NACIONALOR SONICIOS O PROPINSIONALOR SONICIONALOR SONICIONAL

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

Dr. EDUARDO PAYET MEZA Jefe Institucional INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS





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 LINFOMA



#### I. OBJETIVO

Normalizar el procedimiento de trabajo de Citometría de flujo para linfoma.

#### II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS

- Código CPMS (MINSA): 88206

- Código Tarifario INEN: 210303

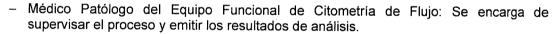


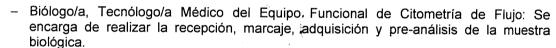
El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Citometría de flujo para linfoma y se aplica a todos los grupos de trabajo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo del Departamento de Patología, involucrados en el procesamiento de muestras para el estudio de diagnóstico y seguimiento de Citometría de flujo para linfoma (neoplasias linfoproliferativas de células maduras).



#### 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:





 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)
- Anticuerpos monoclonales para citometría de flujo. Son anticuerpos producidos por clones de células B y de mieloma llamados "hibridoma" que se unen al mismo epítopo de un antígeno proporcionando así datos altamente específicos. (3.4)









## A INEN

# PNT.DNCC. INEN. 137. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LINFOMA V.01

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

- 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)

#### VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Los linfomas son neoplasias hematológicas que se desarrollan del sistema linfático, que forman parte del sistema inmunitario del cuerpo humano. A los linfomas se les llama tumores sólidos hematológicos para diferenciarlos de las leucemias. Se clasifican en dos tipos: Hodgkin y no Hodgkin, siendo este último dividido en 3 categorías principales, basándose en la morfología y el linaje celular: neoplasias de linfocitos B, neoplasias de linfocitos T y de células NK o células asesinas naturales (del inglés, natural killer). (5.6.7)

La Citometría de flujo mejora significativamente la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de linfoma en muestras con material citológico. La combinación de citometría de flujo y citomorfología pueden llevar a la clasificación especifica de linfoma con bastante rapidez. Inicialmente se necesitará priorizar los marcadores base para el triaje. Con el uso de la citometría de flujo multiparamétrica y los numerosos marcadores inmunofenotípicos que pueden ser empleados simultáneamente es posible diagnosticar muestras hipocelulares. En casos donde la sospecha de linfoma es de una entidad rara, la comunicación cercana entre el citólogo, hematopatólogo y el citometrista se podrá diseñar un panel adecuado de anticuerpos. (1.5-7)



#### 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
- Cabina de seguridad biológica Cámara de bioseguridad clase II
- 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



JUDITH VIDAL AYLLON
Jefa de Citometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141
Instituto Nacional de Entermedades Heoplasicas



Sector Salud



#### PNT.DNCC. INEN. 137. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LINFOMA 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
- Pipeta automática rango variable 100 µL 1000 µL
- Micropipeta de volumen variable 10 μL 100 μL
- Micropipeta de volumen variable 0.5 µL 10 µL.
- Micropipeta volumen fijo 10 µL.
- Porta pipeta de polipropileno tipo carrusel para 7 pipetas
- Pipeta descartable pasteur de vidrio.
- Contador digital hematológico de células.
- Frasco gotero de vidrio ámbar clase A x 100 mL.
- Bomba de succión aspiración (con matraz Erlenmeyer de vidrio graduado 1L).
- Termómetro ambiental.
- Frasco de vidrio graduado 1L con dispensador.
- Piseta de polietileno de 250 µL.
- Mortero de Porcelana 250 mL con pilón.
- Matraz para bomba al vacío de 3L.

#### 7.5 Mobiliario:

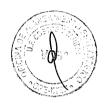
- Módulo de melamina
- Módulo de cómputo (otros)
- Silla giratoria de metal con brazos con espaldar media
- Taburete giratorio rodante

#### 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

















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

#### 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



#### Reactivos: 8.3

#### a) Fluorocromos:

-Ver Anticuerpos, fluorocromos con su respectivo título en anexo Nº 1, según panel correspondiente.

#### b) Soluciones:

- Solución buffer PBS
- Solución PBS + 0.09% de NaN3(azida de sodio) + 0.5% BSA (Albúmina bovina
- 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



#### SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS

#### Servicios Técnicos:

Mantenimiento preventivo de equipamiento

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos

#### 9.2 Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono



DITH VIDAL AYLLON

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





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.
- Biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF): El médico citopatólogo, es el responsable de la toma de biopsia por aspiración; el personal del Equipo Funcional de Citología son los responsables de hacer llegar la muestra hasta el área de recepción de Citometría de Flujo.
- Recepción de muestras externas (referidos de otras instituciones).



#### 10.2 Sistema biológico:

- Médula ósea, sangre periférica o BAAF.

#### 10.3 Recipiente:

- Tubo con anticoagulante EDTA dipotásico.
- Tubo con preservante celular (Transfix) y tubo con buffer salino fosfato (PBS).

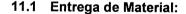


#### 10.4 Conservación y manejo:

- 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:



- 11.1.1 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.



#### 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.







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

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

#### 11.3 Registro de la muestra:

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



11.4.1 Búsqueda de resultados de diagnóstico del paciente en SISINEN.

#### 11.5 Revisión de Historia Clínica:

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

#### 11.6 Coloración y lectura del frotis de muestra Orientación de panel de marcaje:

- Colorear la muestra, previamente rotulada con lápiz para marcar vidrio con 1161 el número correspondiente de citometría y las iniciales del nombre del paciente.
- Lectura de la lámina coloreada con wright para obtener la fórmula 11.6.2 diferencial, que servirá para orientar la elección de los paneles de marcaje.

#### 11.7 Recuento de la celularidad de la muestra:

Se realiza según instructivo de recuento celular aprobado por el área.

#### Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo para recuento de celularidad:

- Adquirir la muestra inmediatamente después de obtener la muestra lisada 11.8.1 en el templado del software de adquisición "Blancos"
- Esta adquisición permitirá obtener el recuento aproximado de los 11.8.2 leucocitos/µL y el volumen de marcaje que se deberá utilizar para obtener un número determinado de eventos.

#### 11.9 Preparación del panel de Screening de neoplasias linfoproliferativa de células maduras:

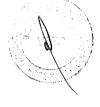
Ver anexo N° 1 para el panel de marcaje que corresponda. 11.9.1

# CMP 14344 RNE. 14141 11 10 Preparación del material para marcaje de la muestra:

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

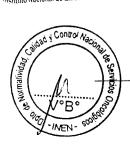












JUDITH VIDAL AYLLON Jefa de Citometria de Flujo



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

### 11.11 Lavado de la Muestra para Marcaje de Inmunoglobulinas:

- 11.11.1 En un tubo de 15 mL cónico añadir 10 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% a la muestra y 350 µL de muestra homogenizada.
- 11.11.2 Mezclar bien.

Sector

Salud

- 11.11.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.11.4 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.
- 11.11.5 Resuspender el botón celular (pellet) completamente
- 11.11.6 Repetir los pasos desde 11.11.1 hasta 11.11.5 dos veces más.

# 11.12 Procesamiento del tubo screening de neoplasias linfoproliferativas de células maduras (LST):

11.12.1 Este marcaje permitirá la identificación y caracterización de los linfocitos, reconociendo los normales/reactivos de los patológicos.

### 11.13 Marcaje e incubación de la muestra con anticuerpos de superficie:

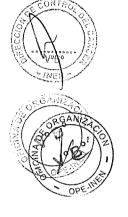
- 11.13.1 Preparar en un solo tubo de citometría la combinación de anticuerpos de screening del panel LST, colocando cada anticuerpo en volumen apropiado, según el título indicado en el panel (ver anexo N° 1).
- 11.13.2 Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

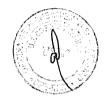
### 11.14 Incubación de la Muestra con Lisante de Hematíes:

- 11.14.1 Añadir 2 mL de 1x FACS Lysing Solution (10x FACS Lysing Solution diluido 1/10 vol / vol en agua destilada (H2Od).
- 11.14.2 Mezclar bien.
- 11.14.3 Incubar durante 10 min a temperatura ambiente protegido de la luz.

#### 11.15 Lavar la Muestra:

- 11.15.1 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.15.2 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.
- 11.15.3 Reconstituir suavemente el pellet
- 11.15.4 Añadir 2 ml de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.15.5 Mezclar bien.
- 11.15.6 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.15.7 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.









JUDITH VIDAL AYLLON

Jefa de Citometria de Flujo

CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas







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

#### 11.16 Reconstitución para la adquisición:

Sector

Salud

11.16.1 Reconstituir suavemente el pellet y agregar luego aproximadamente 250 µL de solución de adquisición (PBS).

#### 11.17 Adquisición de la Muestra en el Citómetro de Flujo:

- 11.17.1 Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4 °C a 8 °C durante 1 h, como máximo.
- Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisition del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo con un mínimo de 500 000 eventos viables si la muestra tiene una infiltración de 20% o más de células neoplásicas (CN) ó 2 000 000 de eventos viables si tiene una infiltración de menos de 20% de CN.

#### 11.18 Análisis de LST y elaboración del panel complementario:

- 11.18.1 El informe del resultado es cualitativo.
- 11.18.2 Los resultados obtenidos después de la adquisición serán evaluados por personal capacitado usando el software INFINICYT.
- 11.18.3 Elegir el panel complementario correspondiente, según los hallazgos encontrados en el tubo de screening con la línea hematológica que caracterice a la población inmadura patológica.
- 11.18.4 Ver en anexo N° 2 los paneles complementarios para marcaje.

#### 11.19 Marcaje del panel complementario de Estudio de Linfomas:

11.19.1 Se procederá al marcaje del panel complementario.

#### 11.20 Preparación del material para marcaje del panel complementario:

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

#### 11.21 Procesamiento de tubos con marcaje de antígenos de superficie:

11.21.1 En esta sección se indica el marcaje de la muestra con los anticuerpos dirigidos solo antígenos de superficie.

#### 1/1.22 Marcaje de muestra con antígenos de superficie:

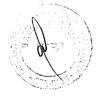
11.22.1 Preparar la mezcla de muestra + anticuerpos, en los tubos a los que les corresponde solo marcadores de superficie, según complementario (ver anexo N° 2) en los tubos de citometría rotulados con el número de tubo según indique el panel complementario con la combinación de anticuerpos superficie.

#### 11.23 Incubación de la Muestra con Lisante de Hematíes:

11.23.1 Añadir 2 mL de 1x FACS Lysing Solution (10x FACS Lysing Solution diluido 1/10 vol / vol en agua destilada (H2Od).















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

- 11.23.2 Mezclar bien
- 11.23.3 Incubar durante 10 min a temperatura ambiente protegido de la luz.

#### 11.24 Lavado de la muestra:

- 11.24.1 Añadir 2 ml de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% a la muestra.
- 11.24.2 Mezclar bien.
- 11.24.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.24.4 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

#### 11.25 Reconstitución para la adquisición:

11.25.1 Reconstituir suavemente el pellet y agregar luego aproximadamente 250ul de solución de adquisición (PBS).

#### 11.26 Adquisición de la Muestra en el Citómetro de Flujo:

- Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4 °C a 8 °C durante 1 h. como máximo.
- Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisition del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo con un mínimo de 500 000 eventos viables si la muestra tiene una infiltración de 20% o más de células neoplásicas (CN) ó 2 000 000 de eventos viables si tiene una infiltración de menos de 20% de CN.

#### 11.27 Procesamiento del Tubos para marcaje combinado de marcaje de antígenos de citoplasma o núcleo:

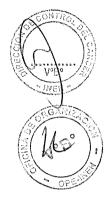
11.27.1 En esta sección se indica el marcaje de la muestra con los anticuerpos dirigidos solo antígenos de citoplasma o núcleo.

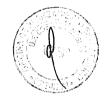
#### 11.28 Marcaje de la Muestra con Anticuerpos de Superficie:

- Preparar la mezcla de muestra + anticuerpos en los tubos a los que les corresponde marcaje combinado de marcadores de superficie, citoplasma y núcleo, según el panel complementario (ver anexo N° 2) en los tubos de citometría rotulados con el número de tubo según indique el panel complementario. Colocar la combinación indicada de anticuerpos contra antígenos de superficie y el volumen de muestra obtenido en el recuento de celularidad.
- 11.28.2 Incubar por 20 minutos en oscuridad y temperatura ambiente.

#### 11.29 Lavado de la Muestra:

- 11.29.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.29.2 Mezclar bien.
- 11.29.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.









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







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

11.29.4 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.

#### 11.30 Fijación de la muestra:

Sector

Salud

- 11.30.1 Colocar 100 uL de solución fijadora del kit de permeabiliación (Solución A) y mezclar bien.
- 11.30.2 Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

#### 11.31 Lavar de la muestra:

- 11.31.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.31.2 Mezclar bien.
- 11.31.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.31.4 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.
- 11.31.5 Reconstituir suavemente el pellet.

#### 11.32 Permeación y lisis de la muestra:

- 11.32.1 Colocar 100 de solución permeabilizante (solución B) y mezclar con la muestra por 10 segundos.
- 11.32.2 La solución B contiene también solución lisante para eliminar a los

#### 11.33 Marcaje de la muestra con anticuerpos intracitoplasmáticos:

11.33.1 Agregar el volumen apropiado de anticuerpos dirigidos contra los marcadores de citoplasma que contiene el panel complementario.

#### 11.34 Centrifugado y lavado para eliminar solución permeabilizante:

- 11.34.1 Añadir 2 ml de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.34.2 Mezclar bien.
- 11.34.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.34.4 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.

#### 11.35 Lavado de muestra:

- 11.35.1 Añadir 2 ml de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.35.2 Mezclar bien.
- 11.35.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.







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

11.35.4 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.

#### 11.36 Reconstitución para la adquisición:

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

### 11.37 Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo:

- 11.37.1 Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4 °C a 8 °C durante 1 h, como máximo.
- 11.37.2 Colocar el tubo de muestra en la pipeta de invección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisition del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo con un mínimo de 500 000 eventos viables si la muestra tiene una infiltración de 20% o más de CN ó 2 500 000 de eventos viables si tiene una infiltración de menos de 20% de CN

#### 11.38 Análisis y Elaboración del pre-informe:

- 11.38.1 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/agosto, 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.
- 11.38.2 El Informe del resultado es cualitativo.
- 11.38.3 Los resultados obtenidos después de la adquisición serán evaluados por personal capacitado usando el software INFINICYT.
- Elaborar el correspondiente Informe como archivo power point ppt. 11.38.4
- 11.38.5 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.

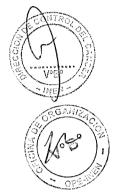
#### 11.39 Análisis y Elaboración del informe final:

11.39.1 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.

#### 11.40 Registro de informe en SISINEN:

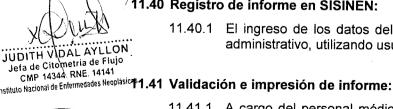
11.40.1 El ingreso de los datos del informe final se lleva a cabo por el personal administrativo, utilizando usuario y contraseña respectiva del SISINEN.

11.41.1 A cargo del personal médico patólogo encargado. Requiere de usuario y contraseña propios en SISINEN.















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

- 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.
- Los informes copiados en el sistema informático SISINEN son validados 11.41.3 por el personal médico responsable.
- En el sistema SISINEN también se puede validar o corregir resultados 11.41.4 discordantes.



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

#### 11.43 Registro de estadísticas por tipo de caso:

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

#### 11.44 Mantenimiento:

### Mantenimiento diario: Consiste en los pasos de lavados matutinos y entre la adquisición de tubos para

evitar interferencias y ruido de fondo en los archivos fcs. Adicionalmente se utilizará una solución estándar con targets conocidos para la calibración de los equipos.

#### 11.44.1 Lavado de equipo:

- Diariamente, al iniciar la jornada de trabajo, se procederá con el encendido y lavado de equipo con detergentes surfactantes especiales para la limpieza de las tubuladuras y celdas del citómetro y se procederá con el encendido electrónico del citómetro de flujo con la función "Start up".
- Luego se procederá al enjuague con varias corridas de agua destilada.

#### 11.44.2 Calibración de equipo:

- Para este paso se requiere adquirir en el citómetro una suspensión de perlas con valores estándar de Intensidad de fluorescencia media.
- Los targets de las perlas de cada canal establecerán en el equipo los reajustes de voltajes (delta o diferencial de PMT) y otros valores que impactarán de manera positiva en las adquisiciones de cada experimento en el citómetro y tiene validez por 24 horas, transcurrido este tiempo caducará y deberá repetirse la calibración.

#### 11.44.3 Control y seguimiento de voltaje:

En el templado del software de adquisición (plantilla de trabajo con las condiciones de adquisición grabadas) se revisará diariamente si la solución estándar (control de estandarización) coincide en las intensidades de fluorescencia media (IFM) de cada canal con los IFM que se dejaron grabados el día de la compensación en la "plantilla ajuste de voltajes".











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









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

#### 11.44.4 Lavado final diario para mantenimiento de equipo:

- Diariamente, al terminar la jornada de trabajo, se procederá con el encendido y lavado de equipo con detergentes surfactantes especiales para la limpieza de las tubuladuras y celdas del citómetro y se procederá con el apagado electrónico del citómetro de flujo con la función "shutdown"
- Luego se procederá al enjuague con varias corridas de agua destilada.



Se realiza una vez por semana para liberar de impurezas y sedimentos de sales a las tubuladuras, jeringa de invección y celda de flujo del citómetro.

#### 11.44.5 Lavado profundo del equipo (Long clean):

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

#### 11.45 Compensación:

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

### 11.45.1 Establecer línea de base:

 Requiere Soluciones estándar (reactivo citometer setup and traking) para establecer las condiciones óptimas del equipo, en cuanto a las ganancias de luz de emisión en cada canal de detección.

#### 11.45.2 Ajuste de voltajes:

Requiere de la adquisición de una suspensión de perlas con valores de IFM estándar para establecer los valores de voltajes en cada canal para obtener el punto óptimo de detección en cada PMT (mejor ganancia de luz de emisión de los fluorocromos).

#### 11.45.3 Cálculo de compensación:

Establecer las restas de compensación en las combinaciones de los 8 canales para evitar el solapamiento del espectro luminoso de la luz de emisión de los fluorocromos, asegurando la lectura apropiada de cada longitud de onda en el canal correspondiente.

#### 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.











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









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

Para esto habrá 2 opciones:

o Positivo débil (-/+), (+d)

Sector

Salud

Positivo intenso (++); (+++)

#### XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

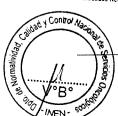
- 1. Sales M. Moraes-Vasconcelos D (Eds), Duarte A. Citometría de Fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa. Sao Paulo 2013.
- 2. Jaffe E. Arber D. Campo E et al. Hematopathology 2nd Edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2017, 5:62-64.
- 3. Van Dongen JJM, Orfao A, Lucio P et al. EuroFlow 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. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th edition. Lyon, IARC 2017.
- 6. Zeppa P, Marino G, Troncone G, et al. Fine-needle cytology and flow cytometry immunophenotyping and subclassification on non-Hodgkin lymphoma: a critical review of 307 cases with technical suggestions. Cancer. 2004;102: 55-65.
- 7. B-cell lymphoma (TCRBCL): limitations in fine-needle aspiration cytodiagnosis. Diagn Cytopathol. 2012; 40: 956-963.

#### XIV. ANEXOS

- Anexo N° 01: Panel de anticuerpos para screening de neoplasias linfoproliferativas de células maduras.
- Anexo N° 02. Panel de anticuerpos para estudio complementario de neoplasias linfoproliferativas de células maduras.
- Anexo N° 03: Control de cambios y mejoras.



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









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

#### ANEXO N° 01

# PANEL DE ANTICUERPOS PARA SCREENING DE NEOPLASIAS LINFOPROLIFERATIVAS DE CÉLULAS MADURAS.

े	_	
N. S. S. S.	189	
	12.1	
	捌	
	7	

	V450	PO	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
LST	CD20/CD4	CD45	CD8/smL	CD56/smK	CD5	CD19/TCRgd	CD3	CD38
	1/1	4	5/5	5/5	10	5/1	5	3
	rcación de este tub							
Adquirir 2	500 000 eventos to	otales en cas	os con < a 20%	de infiltración	nor CF			1

# OPE-10

#### **ANEXO N° 02**

# PANEL DE ANTICUERPOS PARA ESTUDIO COMPLEMENTARIO DE NEOPLASIAS LINFOPROLIFERATIVAS DE CÉLULAS MADURAS.





ara pacientes con CN T CD4+ sólo se marcan tubos 1, 3, 3, 1

DE ENFERNACION NE CONTROL OF CONT

	V450	V500c	FITC	. PE	DEDCD CHE E	DE 6.7		
Tubo 1		<del></del>			PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
IODO T	CD4	CD45	CD7	CD26	CD3	CD2	CD28	CD8
	1	5	10	10	10	2	10	5
Marca	BD	BD	BD	BD	8D	BD	BD	BD
Tubo 2	CD4	CD45	CD27	CCR7	CD3	CD45RO	CD45RA	CD8
******	1	5	10	10	10	5	10	5
Marca	8D	BD	BD		BD	BD	BD	BD
Tubo 3	CD4	CD45	CD5	CD25	CD3	HLADR	cyTCL1	CD8
	1	5	10	10	10	2.5	4	5
Marca	BD	BD	BD	BD	BD	BD	eBiocience	BD
Tubo 4	CD4	CD45	CD57	CD30	CD3		CD11c	CD8
	1	5	10	10	10	_	2	5
Marca	BD	BĐ	BD	BD	BD	8D	BD	BD
Tubo 5	CD4	CD45	cyPerforin	cyGranzyme	CD3	CD16	CD94	CD8
71111	11	5	10	15	10	2	5	5
Marca	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD	8D
Tubo 6	CD4	CD45	_	CD279	CD3	_		CD8
	1	5		10	10		- 1	5
Marca	BD	BD		BD	BD			BD



#### COMPLEMENTARIO LINFOMA NK

Adqu/rir 500 000 eventos totales para casos nuevos

Adquirir 2 000 000 eventos totales para casos control

	V450	V500c	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cv7	APC	APC-H7
Tubo 1	CD2	CD45	CD7	CD26	CD3	CD56	CD5	CD19
	1	5	10	10	10	5	3	5
Marca	BD	BD	BD	BD	BD	BD	8D	BD
Гµbo.2	CD16	CD45	CD57	CD25	CD3	CD56	CD11c	CD19
LLON	5	5	10	10	10	5	2	5
Flujo Marca	BD	BD		BD	BD	BD	BD	BD
(NEOD) Scicas	HLADR	CD45	cyPerforin	cyGranzime	CD3	CD56	CD94	CD19
	1	5	10	15	10	5	5	5
Marca	BD	BD		BD	BD	BD	BD	BD



JUDITH VIDAL A'
Jefa de Citometria d
CMP 14344 RNE.
Instituto Nacional de Enfermedad





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

#### ANEXO Nº 03

#### **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 – 16	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).	31/08/2020	M.C. Judith Vidal Ayllón						





JUDITH VIDAL AYLLON
Jefa de Oitometria de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplasicas







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 MIELOMA

#### I. OBJETIVO

Normalizar el procedimiento de citometría de flujo para mieloma.



#### II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS

- Código CPMS (MINSA): 88202

- Código Tarifario INEN: 210305



#### III. ALCANCE

El presente documento normativo se emplea para estudio de diagnóstico por citometría de flujo de mieloma (neoplasia de células plasmáticas) 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 neoplasia de células plasmáticas.



#### 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.



#### **DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

Citometría de flujo. - La 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 neoplasías. (2)







Dirección de Servicios de Apovo 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 epítopo 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)
- Mieloma de células plasmáticas. Es una enfermedad neoplásica multifocal que produce la proliferación de células plasmáticas anómalas, usualmente asociadas a proteína M en suero y orina y evidencia de daño en órgano. La médula ósea es el sitio de origen de casi todas las células plasmáticas patológicas y en la mayoría de casos hay compromiso y diseminación en médula ósea. La enfermedad presenta un espectro clínico desde asintomático hasta altamente agresivo. (6)
- La citometria de flujo es una técnica que permite discriminar entre células plasmáticas patológicas y normales o reactivas, analizando simultáneamente los diferentes patrones de expresión antigénica. Los antígenos de membrana más utilizados incluyen al CD138, CD38, CD45, CD56, CD19 y cadenas livianas kappa y lambda citoplasmáticas. (7)

Diferentes estudios han demostrado que la sensibilidad de estas técnicas se incrementa significativamente cuando ≥ 6 marcadores se analizan simultáneamente. La CMF de ocho colores (ocho antígenos analizados simultáneamente) logra una sensibilidad de 1 célula patológica en 100.000 (10-5) células plasmáticas totales. (8,9)

#### VII. EQUIPAMIENTO

#### Equipos médico y biomédico:

SIGNIFICANCIA CLÍNICA

- 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
- Cabina de seguridad biológica Camara de bioseguridad clase II
- Microscopio binocular
- Timer
- Agitador de tubos o vórtex
- Bomba de succión aspiración (con matraz Erlenmeyer de vidrio graduado 1L)

### Equipo electromecánico:

Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 36000 Btu Tipo Split

#### Equipo informático:

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

### INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: www.inen.sld.pe e-mail: postmaster@inen.sld.pe



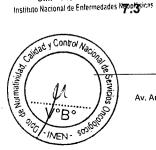








JUDITH VIDAL AYLLON Jefa de Citometria de Flujo CMP 14344 RNE. 14141







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

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.
- Contador digital hematológico de células.
- Frasco gotero de vidrio ambar clase A x 100 mL.
- Bomba de succión aspiración (con matraz erlenmeyer de vidrio graduado 1L).
- Termómetro ambiental.,
- Frasco de vidrio graduado 1L con dispensador.
- Piseta de polietileno de 250 µL.
- Mortero de porcelana 250 mL con pilón.
- Matraz para bomba al vacio de 3L.

#### 7.5 Mobiliario:

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

#### VIII. SUMINISTROS

#### 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

#### Bioseguridad:

- Alcohol gel x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Bolsa de polietileno 72 Cm x 51 Cm color rojo



Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: www.inen.sld.pe e-mail: postmaster@inen.sld.pe



















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

- 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 N° 1, según panel correspondiente

#### b) Soluciones:

- Solución buffer PBS
- 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

#### 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







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

#### Χ. **MUESTRA**

#### Obtención de la muestra: 10.1

- Médula ósea: El personal responsable de procedimientos del Equipo Funcional Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica, están encargados de hacer llegar las muestras 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). Atendidos en el módulo de patología de atención al paciente externo.



Médula ósea o sangre periférica.

#### 10.3 Recipiente:

Tubo con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético dipotásico (EDTA K2)

#### 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 fresca.

#### MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

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

#### 11.1 Entrega de Material:

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



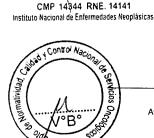






JUDITH VIDAL AYLLON

Jefa de Citometria de Flujo





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

#### 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 del paciente al Sistema Administrativo Hospitalario (SISINEN), e imprimir etiqueta con código de barra.



#### 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 Coloración y lectura del frotis de muestra orientación de panel de marcaje:

- 11.6.1 Colorear la muestra, previamente rotulada con lápiz para marcar vidrio con el número correspondiente de citometría y las iniciales del nombre del paciente.
- 11.6.2 Lectura de la lámina coloreada con Wright para obtener la fórmula diferencial, que servirá para orientar la elección de los paneles de marcaje.



#### 11.7 Recuento de la celularidad de la muestra:

11.7.1 Se realiza según instructivo de recuento celular aprobado por el área.

# 11.8 Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo para recuento de celularidad:

11.8.1 Adquirir la muestra inmediatamente después de obtener la muestra lisada en el templado del software de adquisición "Blancos".



# 11.9 Preparación del panel de screening de estudio de neoplasia de células plasmáticas (PCD):

11.9.1 Ver anexo N° 1 para el panel de marcaje de screening de neoplasia de células plasmáticas.

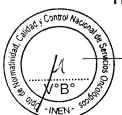


#### 11.10 Preparación del material para marcaje de la muestra con panel screening PCD:

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 Procesamiento de la muestra screening:

11.11.1 El panel consiste en el marcaje de antígenos de superficie y citoplasma, con un panel cuya mayor sensibilidad está orientado a la caracterización





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

> de las células plasmáticas para poder distinguir entre normales/reactivas y patológicas.

### 11.12 Lavado de la muestra para marcaje de inmunoglobulinas:

- 11.12.1 Añadir 10 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% a la muestra.
- 11.12.2 Mezclar bien.
- 11.12.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.12.4 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.
- 11.12.5 Resuspender el botón de leucocitos en el fondo del tubo.

### 11.13 Marcaje e incubación de la muestra con anticuerpos de superficie:

11.13.1 Preparar en un solo tubo de citometría la combinación de anticuerpos de screening del panel PCD, colocando cada anticuerpo dirigido contra marcadores de superficie, en volumen apropiado, según el título indicado en el panel (ver anexo N° 1).

#### 11.14 Lavado de la muestra:

- 11.14.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% a la muestra.
- 11.14.2 Mezclar bien.
- 11.14.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.14.4 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.
- 11.14.5 Resuspender completamente el botón celular (pellet) al fondo del tubo.

#### 11.15 Fijar la muestra:

- 11.15.1 Colocar 100 µL de solución fijadora del kit de permeabilización (Solución
- 11.15.2 Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

7.22

#### 11./16 \_avar la muestra:

- 11.16.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.16.2 Mezclar bien.
- 1.16.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 1.16.4 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.
- 11.16.5 Reconstituir suavemente y por completo el pellet.



















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

#### 11.17 Permeación y lisis de eritrocitos de la muestra:

- 11.17.1 Colocar 100 de solución permeabilizante (solución B) y mezclar con la muestra por 10 segundos
- 11.17.2 La solución B contiene también solución lisante para eliminar a los hematies

#### 11.18 Marcaje con anticuerpos intracitoplasmáticos:

11.18.1 Agregar el volumen apropiado de anticuerpos dirigidos contra los marcadores de citoplasma que contiene el panel (CyLambda, CyKappa) ver marcadores en panel (anexo Nº 1).

#### 11.19 Centrifugado y lavado para eliminar solución permeabilizante:

- 11.19.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.19.2 Mezclar bien.
- 11.19.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.19.4 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.
- 11.19.5 Repetir los pasos 11.16.1 al 11.16.4 una vez más.

#### 11.20 Reconstituir para la adquisición:

11.20.1 Resuspender el sedimento celeiar en 200 µL de PBS + BSA al 0,2%.

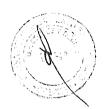
#### 11.21 Adquisición de la muestra screening en el citómetro de flujo:

- 11.21.1 Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4 °C a 8 °C durante 1 h, como máximo.
- 11.21.2 Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisition del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo con un mínimo de 500 000 eventos viables si la muestra tiene una infiltración de 20% o más de blastos ó 2 000 000 de eventos viables si tiene una infiltración de menos de 20% de blastos.
- 11.21.3 Durante la adquisición se evalúa el marcaje adecuado, observando para ello las plantillas, histogramas o gráficas de puntos de cada fluorocromo en el software Facs Diva.
- 11.22 Análisis de PCD, elaboración del pre informe y planeamiento del panel complementario diagnóstico:
  - 11.22.1 El informe del resultado es cualitativo.
- Los resultados obtenidos después de la adquisición serán evaluados por JUDITH VIDAL AYLLON personal capacitado usando el software INFINICYT.
  - Elegir el panel complementario correspondiente, según los hallazgos encontrados en el tubo de screening con la línea hematológica que caracterice a la población inmadura patológica.



Jefa de Citometria de Flujo CMP 14344 RNE. 14141











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

11.22.4 Ver en anexo N° 2 el panel complementario para marcaje.

# 11.23 Preparación del material para marcaje de la muestra con pane complementario:

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

### 11.24 Procesamiento del tubo con panel complementario:

11.24.1 El panel consiste en el marcaje de antígenos de superficie, con un panel cuya mayor sensibilidad está orientado a la caracterización de las células plasmáticas con marcadores de valor pronóstico para poder distinguir entre normales/reactivas y patológicas y aportar mayor información en la clasificación de enfermedad.

### 11.25 Marcaje de muestra con anticuerpos contra antígenos de superficie:

- 11.25.1 Preparar la mezcla de muestra + anticuerpos, en los tubos a los que les corresponde solo marcadores de superficie, según el panel complementario (ver anexo N° 2) en los tubos de citometría rotulados con el número de tubo según indique el panel complementario con la combinación de anticuerpos superficie.
- 11.25.2 Incubar por 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

### 11.26 Incubación de la Muestra con Lisante de Hematíes:

- 11.26.1 Añadir 2 mL de 1x FACS Lysing Solution (10x FACS Lysing Solution diluido 1/10 vol / vol en agua destilada (H2Od).
- 11.26.2 Mezclar bien.
- 11.26.3 Incubar durante 10 min a temperatura ambiente protegido de la luz.

#### 11.27 Lavado la Muestra:

- 11.27.1 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.27.2 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.
- 11.27.3 Reconstituir suavemente el pellet
- 11.27.4 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.27.5 Mezclar bien.
- 11.27.6 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.27.7 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.













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

#### 11.28 Reconstitución para la adquisición en el citómetro de flujo:

11.28.1 Reconstituir suavemente el pellet y agregar luego aproximadamente 250ul de solución de adquisición (PBS).

#### 11.29 Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo:

- 11.29.1 Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4 °C a 8 °C durante 1 h, como máximo.
- 11.29.2 Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisition del programa de adquisición (DIVA sóftware) y grabar los datos para formar el archivo con un mínimo de 500 000 eventos viables si la muestra tiene una infiltración de 20% o más de blastos ó 2 000 000 de eventos viables (2 500 000 eventos totales aproximadamente) si tiene una infiltración de menos de 20% de blastos.

#### 11.30 Análisis y Elaboración del pre-informe:

- 11.30.1 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/agosto", 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.
- 11.30.2 El informe del resultado es cualitativo.
- 11.30.3 Los resultados obtenidos después de la adquisición serán evaluados por personal capacitado usando el software INFINICYT.
- 11.30.4 Elaborar el correspondiente Informe como archivo power point ppt.
- 11.30.5 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.

#### 11.31 Análisis y Elaboración del informe final:

11.31.1 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.

#### 11.32 Registro de informe en SISINEN:

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

#### 11.33 Validación e impresión de informe:

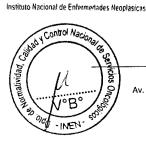
- 11.33.1 A cargo del personal médico patólogo encargado. Requiere de usuario y contraseña propios en SISINEN.
- 11.33.2 Los resultados de los estudios deben interpretarse conjuntamente con la historia clínica del paciente, historial de pruebas en citometría, así como los resultados de otros exámenes si fuera necesario.











JUDITH VIDAL AYLLON

Jefa de Citometria de Flujo CMP 14344 RNE. 14141





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

### 11.36.4 Lavado final diario para mantenimiento de equipo:

- Diariamente, al terminar la jornada de trabajo, se procederá con el encendido y lavado de equipo con detergentes surfactantes especiales para la limpieza de las tubuladuras y celdas del citómetro y se procederá con el apagado electrónico del citómetro de flujo con la función "shutdown"
- Luego se procederá al enjuague con varias corridas de agua destilada.

#### Mantenimiento semanal:

Se realiza una vez por semana para liberar de impurezas y sedimentos de sales a las tubuladuras, jeringa de invección y celda de flujo del citómetro.

#### 11.36.5 Lavado profundo del equipo (Long clean):

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

#### 11.37 Compensación:

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

#### 11.37.1 Establecer línea de base:

 Requiere soluciones estándar (reactivo Citometer Setup and Traking) para establecer las condiciones óptimas del equipo, en cuanto a las ganancias de luz de emisión en cada canal de detección.

#### 11.37.2 Ajuste de voltajes:

Requiere de la adquisición de una suspensión de perlas con valores de IFM estándar para establecer los valores de voltajes en cada canal para obtener el punto óptimo de detección en cada PMT (mejor ganancia de luz de emisión de los fluorocromos)

#### 11.37.3 Cálculo de compensación:

Establecer las restas de compensación en las combinaciones de los 8 canales para evitar el solapamiento del espectro luminoso de la luz de emisión de los fluorocromos, asegurando la lectura apropiada de cada longitud de onda en el canal correspondiente.

#### XII. RESULTADOS ANALÍTICOS

El informe del resultado es cualitativo.

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

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

Para describir la escala de expresión hay 2 opciones:

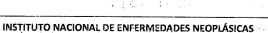


JUDITH VIDAL AYLLON Jefa de Citometria de Flajo-2

CMP 14344 RNE. 14141 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

12.3





Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: www.inen.sld.pe e-mail: postmaster@inen.sld.pe

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

- 11.33.3 Los informes copiados en el sistema informático SISINEN son validados por el personal médico responsable.
- 11.33.4 En el sistema SISINEN también se puede validar o corregir resultados discordantes.

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

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

#### 11.35 Registro de estadísticas por tipo de caso:

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

#### 11.36 Mantenimiento:

#### Mantenimiento diario:

Consiste en los pasos de lavados matutinos y entre la adquisición de tubos para evitar interferencias y ruido de fondo en los archivos fcs. Adicionalmente se utilizará una solución estándar con targets conocidos para la calibración de los equipos.

#### 11.36.1 Lavado de equipo:

- Diariamente, al iniciar la jornada de trabajo, se procederá con el encendido y lavado de equipo con detergentes surfactantes especiales para la limpieza de las tubuladuras y celdas del citómetro y se procederá con el encendido electrónico del citómetro de flujo con la función "Start up".
- Luego se procederá al enjuague con varias corridas de agua destilada.

#### 11.36.2 Calibración de equipo:

- Para este paso se requiere adquirir en el citómetro una suspensión de perlas con valores estándar de intensidad de fluorescencia media.
- Los targets de las perlas de cada canal establecerán en el equipo los reajustes de voltajes (delta o diferencial de PMT) y otros valores que impactarán de manera positiva en las adquisiciones de cada experimento en el citómetro y tiene validez por 24 horas, transcurrido este tiempo caducará y deberá repetirse la calibración.

#### 11.36.3 Control y seguimiento de voltaje:

 En el templado del software de adquisición (plantilla de trabajo con las condiciones de adquisición grabadas) se revisará diariamente si la solución estándar (control de estandarización) coincide en las intensidades de fluorescencia media (IFM) de cada canal con los IFM que se dejaron grabados el día de la compensación en la "plantilla ajuste de voltajes".









JUDITH VIDAL AYLLON
Jefa de C'tometría de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas







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

o Positivo débil (-/+), (+d)

Sector

Salud

o Positivo intenso (++): (+++)

#### XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Sales M, Moraes-Vasconcelos D (Eds), Duarte A. Citometría de Fluxo: aplicações no laboratorio clínico e de pesquisa. Sao 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. 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: Lvon 2017.
- 6. Duarte, P. Importancia clínica de la evaluación del diagnóstico en mieloma múltiple Hematología. Vol 21 Nº Extraordinario XXIII Congreso Argentino de Hematología: 152-157, 2017
- 7. Sherrod AM, Hari P, Mosse CA et al. Minimal residual disease testing after stem cell transplantation for multiple myeloma. Bone Marrow Transplan.t 2016; 51:2-12.
- 8. Paiva B, Jacques J, van Dongen M et al. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. Blood. 2015; 125: 3059-3068.

#### XIV. ANEXOS

- Anexo N° 01: Panel de screening de 8 colores EUROFLOW para estudio de neoplasia de células plasmáticas (PCD).
- Anexo N° 02: Panel complementario para estudio de neoplasia de células plasmáticas (PCD).
- Anexo N° 03: Control de cambios y mejoras.



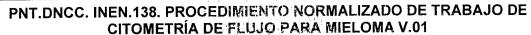










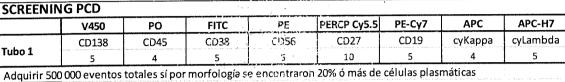


Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

#### ANEXO Nº 01.

# PANEL DE SCREENING DE 8 COLORES EUROFLOW PARA ESTUDIO DE NEOPLASIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS (PCD)







Adquirir 2 500 000 eventos totales sí por morfología se encontraron menos de 20% de células plasmáticas



#### ANEXO N° 2

# PANEL COMPLEMENTARIO PARA ESTUDIO DE NEOPLASIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS (PCD)



SCREENING PCD								
	V450	PO	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
	CD138	CD45	CD38	CD28		CD19	CD117	CD81
Tubo 2	5	4	5	20		5	5	5

Adquirir 500 000 eventos totales sí por morfología se encontraron 20% ó más de células plasmáticas Adquirir 2 500 000 eventos totales sí por morfología se encontraron menos de 20% de células plasmáticas



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







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**

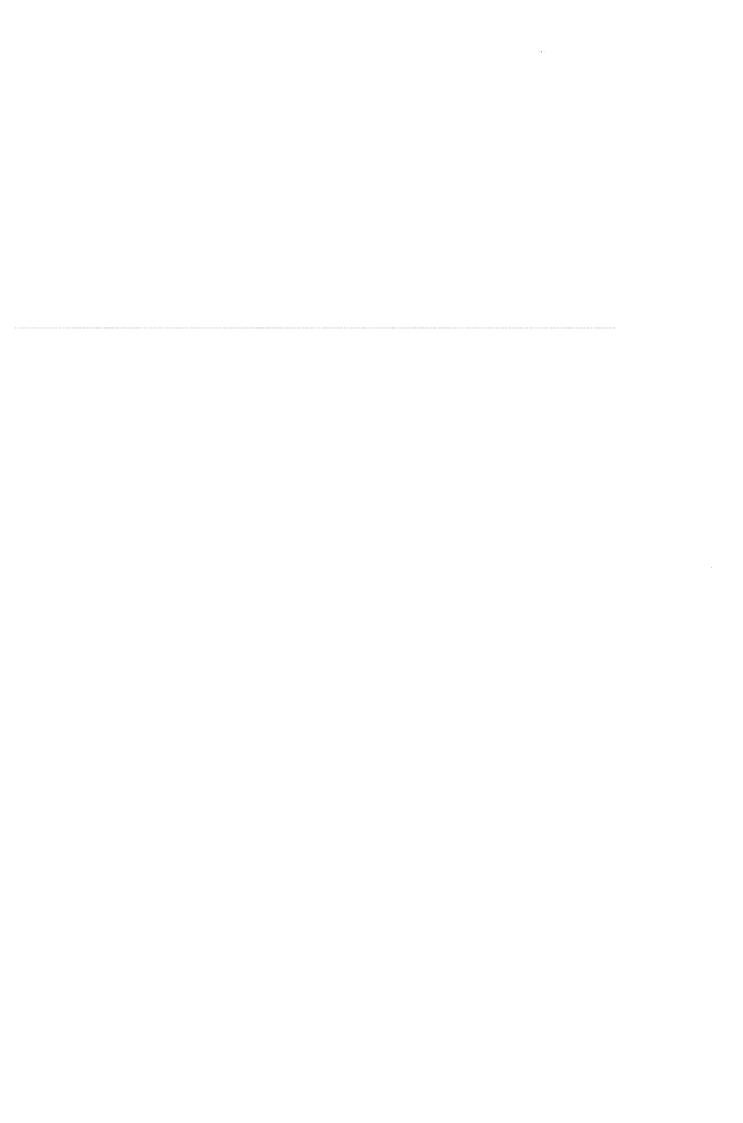
		CONTROL DE CAM	IBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)			
01	1-15	Se elabora PNT según DA N° 001- 2019-INEN/DICON- DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276- 2019-J/INEN).	31/08/2020	M.C. Judith Vidal Ayllón			





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







#### PNT.DNCC. INEN 139. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL DE LEUCEMIA 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 ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL DE LEUCEMIA

#### I. **OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de citometría de flujo para enfermedad mínima residual (EMR) de leucemia

#### II. **IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

Código CPMS (MINSA): 88188.01

Sector

Salud

Código Tarifario INEN: 210313

#### **ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Citometría de flujo para enfermedad mínima residual de leucemia 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 seguimiento de leucemias agudas.

### IV. RESPONSABILIDADES

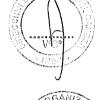
Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Citometría de Flujo del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- 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.

#### **DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

Citometría de flujo. - La 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 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas 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)

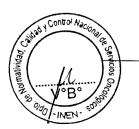














#### PNT.DNCC. INEN 139. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL DE LEUCEMIA V.01

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 epítopo de un antigeno 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)
- 44.8 A. 45.45.8 W Leucemia aguda. - Son neoplasias de células de tejido hematopoyético, inmaduras, pudiendo ser de estirpe mieloide o linfoide B o T. Las leucemias mieloides y linfoblástica B se originan en médula ósea, mientras que la de células T tiene su origen en el timo. Están clasificados en la OMS 2017 dentro de la clasificación de tumores de tejido hematopoyético y tejido linfoide (5)

#### SIGNIFICANCIA CLÍNICA

El estudio de la enfermedad mínima residual (EMR), por citometría de flujo, es el método utilizado para la detección de blastos en pacientes morfológicamente en remisión completa. En pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), se considera un factor de riesgo independiente asociado con baja sobrevida libre de eventos (SLE) (6)

#### VII. EQUIPAMIENTO

#### Equipos médico y biomédico: 7.1

- Citómetro de Flujo FACS Canto II de 8 colores: V450, V500, FITC, PE, Percy Cy5.5, PE Cy7, APC y APC-H7
- Refrigeradora/ conservadora de 4 °C para reactivos en stock. 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.
- Cabina de seguridad biológica Cámara de bioseguridad clase II
- Microscopio binocular
- Timer
- Agitador de tubos o vórtex
- Bomba de succión aspiración (con matraz Erlenmeyer de vidrio graduado 1L)

#### Equipo Electromecánico:

Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 36000 Btu Tipo Split

#### 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











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

#### 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.
- Contador digital hematológico de células.
- Frasco gotero de vidrio ámbar clase A x 100 mL.
- Bomba de succión aspiración (con matraz Erlenmeyer de vidrio graduado 1L).
- Termómetro ambiental.
- Frasco de vidrio graduado 1L con dispensador.
- Piseta de polietileno de 250 µL.
- Mortero de porcelana 250 mL con pilón.
- Matraz para bomba al vacío de 3L.

#### 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:

- 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

#### Bioseguridad:

- Alcohol gel x 1 L
- Alcohol etilico (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



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











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

- 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 quirurgica 3 pliegues



#### 8.3 Reactivos:

#### a) Fluorocromos:

Ver anticuerpos, fluorocromos con su respectivo título en anexo N° 1, según panel correspondiente

#### b) Soluciones:

- Solución buffer PBS
- 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

#### Servicios Técnicos:

#### Mantenimiento preventivo de equipamiento:



- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos

#### 9.2 Servicios públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

Westletto Nacional de Enfermedates Neophili UESTRA

## 10.1 Obtención de la muestra:

Médula ósea, Sangre periférica: es realizado por el área de trabajo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del

#### INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: www.inen.sld.pe e-mail: postmaster@inen.sld.pe







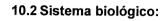




Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento -Departamento de Patología Equipo Funcional de Citometría de Flujo

Departamento de Oncología Médica y el Servicio de Procedimientos Especiales del Equipo Funcional de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.

Recepción de muestras externas (referidos de otras instituciones).



- Médula ósea, Sangre periférica.

#### 10.3 Recipiente:

- Tubo con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) dipotásico (K2).

#### 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 fresca.

## 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 y revisión de la muestra y verificación de correspondencia con orden:

- 11.2.1 Verificar la correspondencia de muestras y orden.
- Revisar condiciones de la muestra, tubo adecuado, cantidad de muestra 11.2.2 adecuada ausencia de coágulos ni hemólisis.
- 11.2.3 Ingresar los datos al Sistema Administrativo Hospitalario (SISINEN), e imprimir etiqueta con código de barra.

#### Instituto Nacional de Enfermedades Negotia 1.3 Trillado de datos del paciente en SISINEN:

11.3,1 Búsqueda de resultados de diagnóstico del paciente en SISINEN.



Jefa de Citometria de Flujo CMP 14344 RNE. 14141







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

# 11.4 Codificación numérica correlativa de la orden y muestras. 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.



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

# 11.6 Coloración y formulación de la lámina con frotis de muestra para orientación de panel de marcaje:

- 11.6.1 Colorear la muestra, previamente rotulada con lápiz para marcar vidrio con el número correspondiente de citometría y las iniciales del nombre del paciente.
- 11.6.2 Lectura de la lámina coloreada con wright para obtener la fórmula diferencial, que servirá para orientar la elección de los paneles de marcaje.

#### 11.7 Revisión de Historia Clínica:

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

#### 11.8 Recuento de la celularidad de la muestra:

Según instructivo de recuento celular aprobado por el área.

11.9 Preparación de panel de marcaje de enfermedad mínima residual:

(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).

#### $\sqrt{1.11}$ Marcaje de la muestra con anticuerpos de superficie columnares:

11.11.1 Preparar en un solo tubo de citometría la combinación de anticuerpos columnares del panel (si lo tuviera), mezclando en partes proporcionales a lo indicado en el panel, cada anticuerpo: multiplicando el volumen del título del anticuerpo por el número de tubos que llevará dicho anticuerpo y colocar el volumen final al fondo del tubo donde se preparará la mezcla de anticuerpos columnares.











JUDITH VIDAL AYLLON Jefa de Citometria de Flujo

CMP 14344 RNE. 14141 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas







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

## 11.12 Marcaje e incubación de la muestra con anticuerpos no columnares:

- 11.12.1 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 que se busque identificar.
- 11.12.2 Añadir el volumen adecuado de muestra, para la adquisición de 2 500 000 eventos totales (según recuento celular).
- 11.12.3 Si es necesario, utilice PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% para alcanzar un volumen final de 100 µL por tubo de reacción.
- 11.12.4 Mezclar bien e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.

# 11.13 Lisis y centrifugación para eliminar hematíes:

- 11.13.1 Añadir 2 mL de 1x FACS Lysing Solution (10x FACS Lysing Solution diluido 1/10 vol / vol en agua destilada (H2Od).
- 11.13.2 Mezclar bien.
- 11.13.3 Incubar durante 10 min a temperatura ambiente protegido de la luz.

#### 11.14 Lavar la muestra:

- 11.14.1 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.14.2 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.
- 11.14.3 Añadir 2 ml de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.14.4 Mezclar bien.
- 11.14.5 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.14.6 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.

#### 11.15 Reconstituir para la adquisición:

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

# 11.16 Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo:

- 11.16.1 Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4 °C a 8 °C durante 1 h, como máximo.
- 11.16.2 Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisition del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo con un mínimo de 2 millones de eventos viables.
- 11.16.3 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.











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

#### 11.17 Análisis y Elaboración del pre-informe:

- 11.17.1 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/agosto, 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 liminicyt.
- 11.17.2 El informe del resultado es cualitativo.
- 11.17.3 Los resultados obtenidos después de la adquisición serán evaluados por personal capacitado usando el software INFINICYT.
- 11.17.4 Elaborar el correspondiente Informe como archivo power point ppt.
- 11.17.5 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.

#### 11.18 Análisis y Elaboración del informe final:

11.18.1 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.

#### 11.19 Registro de informe en SISINEN:

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

#### 11.20 Validación e impresión de informe:

- 11.20.1 A cargo del personal médico patólogo encargado. Requiere de usuario y contraseña propios en SISINEN.
- 11.20.2 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.
- 11.20.3 Los informes copiados en el sistema informático SISINEN son validados por el personal médico responsable.
- 11.20.4 En el sistema SISINEN también se puede validar o corregir resultados discordantes.

#### 11.21 Entrega de informe y firma del paciente en cuaderno de cargo:

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

# Instituto Nacional de Enfermedades Neoplasicas 11.22 Registro de estadísticas por tipo de caso:

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



JUDITH VIDAL AYLLON

Jefa de Citometria de Flujo CMP 14344 RNE 14141













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

#### 11.23 Mantenimiento:

#### Mantenimiento diario:

Consiste en los pasos de lavados matutinos y entre la adquisición de tubos para evitar interferencias y ruido de fondo en los archivos fcs. Adicionalmente se utilizará una solución estándar con targets conocidos para la calibración de los equipos.

#### 11.23.1 Lavado de equipo:

- Diariamente, al iniciar la jornada de trabajo, se procederá con el encendido y lavado de equipo con detergentes surfactantes especiales para la limpieza de las tubuladuras y celdas del citómetro y se procederá con el encendido electrónico del citómetro de flujo con la función "Start up".
- Luego se procederá al enjuague con varias corridas de agua destilada.

#### 11.23.2 Calibración de equipo:

- Para este paso se requiere adquirir en el citómetro una suspensión de perlas con valores estándar de Intensidad de fluorescencia media.
- Los targets de las perlas de cada canal establecerán en el equipo los reajustes de voltajes (delta o diferencial de PMT) y otros valores que impactarán de manera positiva en las adquisiciones de cada experimento en el citómetro y tiene validez por 24 horas, transcurrido este tiempo caducará y deberá repetirse la calibración.

#### 11.23.3 Control y seguimiento de voltaje:

• En el templado del software de adquisición (plantilla de trabajo con las condiciones de adquisición grabadas) se revisará diariamente si la solución estándar (control de estandarización) coincide en las intensidades de fluorescencia media (IFM) de cada canal con los IFM que se dejaron grabados el día de la compensación en la "plantilla ajuste de voltajes".

# 11.23.4 Lavado final diario para mantenimiento de equipo:

- Diariamente, al terminar la jornada de trabajo, se procederá con el encendido y lavado de equipo con detergentes surfactantes especiales para la limpieza de las tubuladuras y celdas del citómetro y se procederá con el apagado electrónico del citómetro de flujo con la función "shutdown"
- Luego se procederá al enjuague con varias corridas de agua destilada.

#### Mantenimiento semanal:

Se realiza una vez por semana para liberar de impurezas y sedimentos de sales a las tubuladuras, jeringa de inyección y celda de flujo del citómetro.

11.23.5 Lavado profundo del equipo (Long clean)





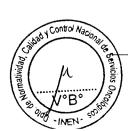






Jefa de Citometria de Flujo

CMP 14344 RNE. 14141 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas





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

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

#### 11.24 Compensación:

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

#### 11,24.1 Establecer linea de base:

 Requiere Soluciones estándar (reactivo citometer setup and traking) para establecer las condiciones óptimas del equipo, en cuanto a las ganancias de luz de emisión en cada canal de detección.

#### 11.24.2 Ajuste de voltajes:

 Requiere de la adquisición de una suspensión de perlas con valores de IFM estándar para establecer los valores de voltajes en cada canal para obtener el punto óptimo de detección en cada PMT (mejor ganancia de luz de emisión de los fluorocromos).

#### 11.24.3 Cálculo de compensación:

 Establecer las restas de compensación en las combinaciones de los 8 canales para evitar el solapamiento del espectro luminoso de la luz de emisión de los fluorocromos, asegurando la lectura apropiada de cada longitud de onda en el canal correspondiente.

# 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:

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

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





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

#### XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Sector

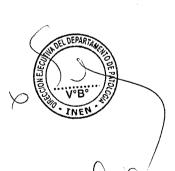
Salud

- 1. Sales M, Moraes-Vasconcelos D (Eds), Duarte A. Citometría de Fluxo: aplicações no laboratorio clínico e de pesquisa. Sao 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. 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. Soria, M. Enfermedad Mínima Residual por Citometría de Flujo en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda. Hematología, Vol. 16 Nº 1: 42-46

#### **XIV. ANEXOS**

- Anexo N° 01: Panel de anticuerpos para EMR de leucemia aguda.
- Anexo N° 02: Control de cambios y mejoras.





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



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS





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

#### ANEXO Nº 01

#### PANEL DE ANTICUERPOS PARA EMR DE LEUCEMIA AGUDA

EMR LLA	EMR LLA-B												
	V450	V500	FITC	PE	PERCF Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7					
	CD20	CD45	CD81	CD123/CD66c	CD34	CD19	CD10	CD38					
Tubo 1	1	5	5 .	5/5	7	5	. 5	3					
	CD20	CD45	CD81 .	CD73/CD304	CD84	CD19	0010	CD38					
Tubo 2	1	5	3	5 c/u	7	S	5	3					

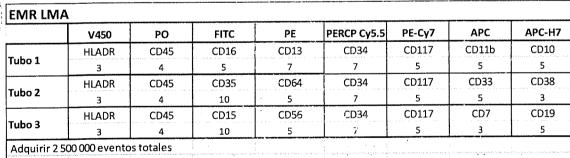
<20% blastos en lámina, adquirir 2 000 000 eventos

En los casos CD66c/CD123 negativos marcar con CD73, CD304

Recaída adquirir 500 000 eventos.

EMR LPA						•	1 100	
Į.	V450	V450	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	AF 750
	HLADR	CD45	CD15	CD13	CD34	CD117	СуМРО	CD11b
Tubo 1	3	5	10	7	7	5	3	5
Adguirir 2 50	3 0 000 evento	s totales	10	/		5	3	<u></u>







EMR LLA T											
	V450	V500	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7			
	cyCD3	CD45	nuTdT	CD99	CD5	CD19	CD1a	smCD3			
Tubo 1	7	5	10	5	10	5	10	3			
	cyCD3	CD45	CD2	CD56	CD4	CD8	CD7	smCD3			
Tubo 2	7	5	5	5	7	5	2	3			

Adquirir 2 500 000 eventos totales

Tubo 2 es opcional, marcar después de revisar tubo 1.

En caso de recaída (más de 20% de blastos) sólo marcar el primer tubo

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





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

#### **ANEXO N° 02**

#### **CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

	CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS									
Very	VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)					
ORGANIZAC ORGANIZAC OPENI	01	1 - 13	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).	31/08/2020	M.C. Judith Vidal Ayllón					





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





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 **DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA (DEBUT)**

#### **OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de citometría de flujo para diagnóstico de leucemia (DEBUT)

#### II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS

Código CPMS (MINSA): 88204.01

Código Tarifario INEN: 210301

#### III. **ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de citometría de flujo para diagnóstico de leucemia 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 seguimiento de leucemias agudas.

#### 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.

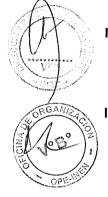
#### **DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- Citometría de flujo. La 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)
- Anticuerpos monoclonales para Citometría de Flujo. Son anticuerpos producidos por clones de células B y de mieloma llamados "hibridoma" que se unen al mismo

epítopo de un antígeno proporcionando así datos altamente específicos. (3.4)

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: www.inen.sld.pe e-mail: postmaster@inen.sld.pe















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

- 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 aguda. Son neoplasias de células de tejido hematopoyético, inmaduras, pudiendo ser de estirpe mieloide o linfoide B o T. Las leucemias mieloides y linfoblástica B se originan en médula ósea, mientras que la de células T tiene su origen en el timo. Están clasificados en la OMS 2017 dentro de la clasificación de tumores de tejido hematopoyético y tejido linfoide (5)

#### /I. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

El diagnóstico por citometría de flujo en pacientes con leucemia aguda tiene tres aplicaciones principales: establecer la categoría diagnóstica de la enfermedad, clasificación pronóstica y efectividad del tratamiento. Desde hace aproximadamente dos décadas el inmunofenotipo por citometría de flujo multiparamétrica ha sido la técnica de elección para el diagnóstico de leucemias, debido a que cumple con los requerimientos para ello: es técnica rápida, de amplia aplicabilidad en el diagnóstico y durante el seguimiento y enfoque preciso en la población de células malignas utilizando proteínas unidas a la membrana e intracelulares como objetivos. (3)

#### VII. EQUIPAMIENTO

#### 7.1 Equipos médico y biomédico:

- Citómetro de Flujo FACS Canto II de 8 colores: V450, V500, FITC, PE, Percy Cy5.5, PE Cy7, APC y APC-H7
- Refrigeradora/ conservadora de 4 °C para reactivos en stock. Refrigeradora/ conservadora de 4 °C para reactivos en stock
- Refrigeradora eléctrica 4 °C para reactivos en uso
- Centrifuga de mesa con buckets para tubos de diferente tamaño
- Cabina de seguridad biológica Cámara de bioseguridad clase II
- 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















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

#### 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 uL 100 uL
- Micropipeta de volumen variable 0.5 µL 10 µL
- Porta pipeta de polipropileno tipo carrusel para 7 pipetas
- Pipeta descartable pasteur de vidrio.
- Contador digital hematológico de células.
- Frasco gotero de vidrio ámbar clase A x 100 mL.
- Bomba de succión aspiración (con matraz Erlenmeyer de vidrio graduado 1L).
- Termómetro ambiental.

Sector

Salud

- Frasco de vidrio graduado 1L con dispensador.
- Piseta de polietileno de 250 µL.
- Mortero de porcelana 250 mL con pilón.
- Matraz para bomba al vacío de 3L.

#### 7.5 Mobiliario:

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

#### VIII. SUMINISTROS

#### 8.1 Insumos y material:

- Guantes de nitrilo descartables.
- Lentes protectores de policarbonato.
- 1 tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA<sub>K2</sub>
- 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

#### 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















# PERÚ

## PNT.DNCC. INEN 140. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA (DEBUT) 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:

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

#### b) Soluciones:

- Solución buffer PBS
- 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

#### X. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS

#### 9.1 Servicios Técnicos:

#### Mantenimiento preventivo de equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondiciónado
- Equipos eléctricos

#### 9.2 Servicios públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

#### **MUESTRA**

#### 10.1 Obtención de la muestra:

- Médula ósea: es realizado por el área de trabajo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y el Servicio de Procedimientos Especiales del Equipo Funcional de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.
- 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).











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

#### 10.2 Sistema biológico:

Médula ósea, Sangre periférica.

#### 10.3 Recipiente:

- Tubo con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) dipotásico (K2).

#### 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 fresca.

#### MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

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

#### 11.1 Entrega de Material:

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

#### 11.2 Recepción de la muestra:

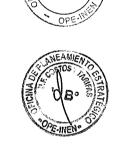
- 11.2.1 Verificar la correspondencia de muestras y orden.
- Revisar condiciones de la muestra, tubo adecuado, cantidad de muestra 11.2.2 adecuada ausencia de coágulos ni hemólisis.
- 11.2.3 Ingresar los datos al Sistema Administrativo Hospitalario (SISINEN), e imprimir etiqueta con código de barra.

#### 11.3 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 del paciente al Sistema Administrativo Hospitalario (SISINEN), e imprimir etiqueta con código de barra.

#### Trillado de datos del paciente en SISINEN:

11.4.1 Búsqueda de resultados de diagnóstico del paciente en SISINEN.











Dirección de Servicios de Apovo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Fluio

#### 11.5 Revisión de Historia Clínica:

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

#### Coloración y lectura del frotis de muestra Orientación de Panel de Marcaje:

- Colorear la muestra, previamente rotulada con lápiz de para marcar vidrio con el número correspondiente de citometría y las iniciales del nombre del paciente.
- Lectura de la lámina coloreada con Wright para obtener la fórmula 11.6.2 diferencial, que servirá para orientar la elección de los paneles de marcaje.

#### 11.7 Recuento de la celularidad de la muestra:

Se realiza según instructivo de recuento celular aprobado por el área. 11.7.1

#### 11.8 Preparación del panel de Screening:

Ver Anexo N° 1 para el panel de marcaje que corresponda. 11.8.1

#### 11.9 Preparación del material para marcaje de la muestra:

El personal Biólogo/a, Tecnólogo/a Médico a cargo debe prever el material 11.9.1 que requiera para el marcaje (tubos, punteras, pipetas, reactivos, soluciones de trabajo y buffer de lavado y adquisición).

#### 11.10 Procesamiento del tubo orientador de leucemias agudas (ALOT):

Preparar en un solo tubo de citometría la combinación de anticuerpos de screening del panel ALOT, colocando cada anticuerpo en volumen apropiado, según el título indicado en el panel (ver anexo N°1).

#### 11.11 Lavado de la muestra:

- 11.11.1 Añadir 2 ml de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% a la muestra.
- 11.11.2 Mezclar bien.
- 11.11.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 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.

#### 11.12 Fijar la muestra:

- 11.12.1 Colocar 100 µL de solución fijadora del kit de permeabilización (Solución
- 11.12.2 Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

11.13.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular

## 11.13 Lavar la muestra:



JUDITH VIDAL AYLLON

iefa de Citometria de Flujo CMP 14344 RNE. 14141 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas









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

11.13.2 Mezclar bien.

Sector

Salud

- 11.13.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.13.4 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.
- 11.13.5 Reconstituir suavemente el pellet.

#### 11.14 Permeabilizar la muestra:

- 11.14.1 Colocar 100 de solución permeabilizarte (solución B) y mezclar con la muestra por 10 segundos.
- 11.14.2 La solución B contiene también solución lisante para eliminar a los hematies.

#### 11.15 Marcaje con anticuerpos intracitoplasmáticos:

11.15.1 Agregar el volumen apropiado de anticuerpos dirigidos contra los marcadores de citoplasma que contiene el panel (CyCD3, CYCD79a, CyMPO).

# 11.16 Centrifugado y lavado para eliminar solución permeabilizante:

- 11.16.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.16.2 Mezclar bien.
- 11.16.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.16.4 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.
- 11.16.5 Repetir los pasos 11.16.1 al 11.16.4 una vez más.

#### 11.17 Reconstituir para la adquisición:

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

## 11.18 Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo:

- 11.18.1 Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4 °C a 8 °C durante 1 h, como máximo.
- 11.18.2 Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisition del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo con un mínimo de 500 000 eventos viables si la muestra tiene una infiltración de 20% o más de blastos ó 2 000 000 de eventos viables si tiene una infiltración de menos de 20% de blastos.
- 11.18.3 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.
- 11.18.4 Análisis de ALOT y elaboración del panel complementario diagnóstico:









VIDAL AYLLON

Jefa de Citometria de Flujo CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas



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

- 11.18.5 El Informe del resultado es cualitativo.
- 11.18.6 Los resultados obtenidos después de la adquisición serán evaluados por personal capacitado usando el software INFINICYT.
- 11.18.7 Elegir el panel complementario correspondiente, según los hallazgos encontrados en el tubo de screening con la línea hematológica que caracterice a la población inmadura patológica.
- 11.18.8 Ver en anexo N° 2 los paneles complementarios para marcaje.

#### 11.19 Marcaje del panel complementario de leucemia aguda:

11.19.1 Se procederá al marcaje del panel complementario.

## 11.20 Preparación del material para marcaje del panel complementario:

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

## 11.21 Procesamiento de tubos con marcaje de antígenos de superficie:

11.21.1 En esta sección se indica el marcaje de la muestra con los anticuerpos dirigidos solo antígenos de superficie.

#### 11.22 Marcaje de muestra con antígenos de superficie:

11.22.1 Preparar la mezcla de muestra + anticuerpos, en los tubos a los que les corresponde solo marcadores de superficie, según el panel complementario (ver anexo N° 2) en los tubos de citometría rotulados con el número de tubo según indique el panel complementario con la combinación de anticuerpos superficie.

#### 11.23 Incubación de la Muestra con Lisante de Hematíes Registro en SISINEN:

- 11.23.1 Añadir 2 mL de 1x FACS Lysing Solution (10x FACS Lysing Solution diluido 1/10 vol / vol en agua destilada (H2Od).
- 11.23.2 Mezclar bien.
- 11.23.3 Incubar durante 10 min a temperatura ambiente protegido de la luz.

#### 11.24 Lavar la Muestra:

- 11.24.1 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.24.2 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.
- JUDITH VIDAL AYLLON 11.24.3 Reconstituir suavemente el pellet
- Jefa de Citometria de Flujo 11.24.4 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular CMP 14344 RNE. 14141
- Instituto Nacional de Enfermedades Neoplàsicas 11.24.5 Mezclar bien.
  - 11.24.6 Centrifugar durante 5 min a 540 g.







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

11.24.7 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.

#### 11.25 Reconstitución para la adquisición:

Reconstituir suavemente el pellet y agregar luego aproximadamente 11.25.1 250uL de solución de adquisición (PBS).

# 11.26 Adquisición de la Muestra en el Citómetro de Flujo:

- Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4 °C a 8 °C durante 1 h, como máximo.
- Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisition del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo con un mínimo de 500 000 eventos viables si la muestra tiene una infiltración de 20% o más de blastos ó 2 000 000 de eventos viables si tiene una infiltración de menos de 20% de blastos.

# 11.27 Procesamiento del Tubos con marcaje de antígenos de citoplasma o núcleo:

11.27.1 En esta sección se indica el marcaje de la muestra con los anticuerpos dirigidos solo antígenos de citoplasma o núcleo.

# 11.28 Marcaje de la Muestra con Anticuerpos de Superficie:

- Preparar la mezcla de muestra + anticuerpos en los tubos a los que les corresponde marcaje combinado de marcadores de superficie, citoplasma y núcleo, según el panel complementario (ver anexo N° 2) en los tubos de citometría rotulados con el número de tubo según indique el panel complementario. Colocar la combinación indicada de anticuerpos contra antígenos de superficie y el volumen de muestra obtenido en el recuento de celularidad.
- 11.28.2 Incubar por 20 minutos en oscuridad y temperatura ambiente.

#### 11.29 Lavado de la Muestra:

- 11.29.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.29.2 Mezclar bien.
- 11.29.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.29.4 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.

# CMP 14344 KNE. 14141 situto Nacional de Enfermedades Neoplásical 1.30 Fijación de la muestra:

- Colocar 100 uL de solución fijadora del kit de permeabilización (Solución A) y mezclar bien.
- 11.30.2 Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.



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







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

#### 11.31 Lavar de la muestra:

- 11.31.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.31.2 Mezclar bien.

Sector

Salud

- 11.31.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.31.4 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.
- 11.31.5 Reconstituir suavemente el pellet.

#### 11.32 Permeación y lisis de la muestra:

- 11.32.1 Colocar 100 de solución permeabilizante (solución B) y mezclar con la muestra por 10 segundos.
- 11.32.2 La solución B contiene también solución lisante para eliminar a los hematies.

# 11.33 Marcaje de la muestra con anticuerpos intracitoplasmáticos:

Agregar el volumen apropiado de anticuerpos dirigidos contra los marcadores de citoplasma que contiene el panel (CyCD3, CYCD79a, CyMPO).

#### 11.34 Centrifugado y lavado para eliminar solución permeabilizante:

- 11.34.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.34.2 Mezclar bien.
- 11.34.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.34.4 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.

#### 11.35 Lavado de muestra:

- 11.35.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.35.2 Mezclar bien.
- 11.35.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- Descarte el sobrenadante usando una pipeta pasteur o un sistema de 11.35.4 vacío sin alterar el sedimento celular, dejando aproximadamente 50 µL de volumen residual en cada tubo.

# JUDITH VIDAL AYLLON

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





DEPAR







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

#### 11.37 Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo:

- 11.37.1 Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4 °C a 8 °C durante 1 h, como máximo.
- 11.37.2 Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisition del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo con un mínimo de 500 000 eventos viables si la muestra tiene una infiltración de 20% o más de blastos ó 2 000 000 de eventos viables si tiene una infiltración de menos de 20% de blastos

## 11.38 Análisis y Elaboración del pre-informe:

- 11.38.1 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/agosto, 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.
- 11.38.2 El informe del resultado es cualitativo.
- 11.38.3 Los resultados obtenidos después de la adquisición serán evaluados por personal capacitado usando el software INFINICYT.
- 11.38.4 Elaborar el correspondiente Informe como archivo power point ppt.
- 11.38.5 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.

## 11.39 Análisis y Elaboración del informe final:

11.39.1 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.

#### 11.40 Registro de informe en SISINEN:

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

#### 11.41 Validación e impresión de informe:

- 11.41.1 A cargo del personal médico patólogo encargado. Requiere de usuario y contraseña propios en SISINEN.
- 11.41.2 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.
- 11.41.3 Los informes copiados en el sistema informático SISINEN son validados por el personal médico responsable.
- 11.41.4 En el sistema SISINEN también se puede validar o corregir resultados discordantes

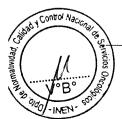








Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas







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

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

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

#### 11.43 Registro de estadísticas por tipo de caso:

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

#### 11.44 Mantenimiento:

#### Mantenimiento diario:

Consiste en los pasos de lavados matutinos y entre la adquisición de tubos para evitar interferencias y ruido de fondo en los archivos fcs. Adicionalmente se utilizará una solución estándar con targets conocidos para la calibración de los equipos.

#### Lavado de equipo: 11.44.1

- Diariamente, al iniciar la jornada de trabajo, se procederá con el encendido y lavado de equipo con detergentes surfactantes especiales para la limpieza de las tubuladuras y celdas del citómetro y se procederá con el encendido electrónico del citómetro de flujo con la función "Start up".
- Luego se procederá al enjuague con varias corridas de agua destilada.

#### 11.44.2 Calibración de equipo:

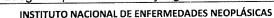
- Para este paso se requiere adquirir en el citómetro una suspensión de perlas con valores estándar de Intensidad de fluorescencia media.
- Los targets de las perlas de cada canal establecerán en el equipo los reajustes de voltajes (delta o diferencial de PMT) y otros valores que impactarán de manera positiva en las adquisiciones de cada experimento en el citómetro y tiene validez por 24 horas, transcurrido este tiempo caducará y deberá repetirse la calibración.

#### 11.44.3 Control y seguimiento de voltaje:

En el templado del software de adquisición (plantilla de trabajo con las condiciones de adquisición grabadas) se revisará diariamente si la solución estándar (control de estandarización) coincide en las intensidades de fluorescencia media (IFM) de cada canal con los IFM que se dejaron grabados el día de la compensación en la "plantilla ajuste de voltajes".

#### 11.44.4 Lavado final diario para mantenimiento de equipo:

- Diariamente, al terminar la jornada de trabajo, se procederá con el encendido y lavado de equipo con detergentes surfactantes especiales para la limpieza de las tubuladuras y celdas del citómetro y se procederá con el apagado electrónico del citómetro de flujo con la función "shutdown"
- Luego se procederá al enjuague con varias corridas de agua destilada.



Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web. www.inen.sld.pe e-mail: postmaster@inen.sld.pe















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

#### Mantenimiento semanal

Se realiza una vez por semana para liberar de impurezas y sedimentos de sales a las tubuladuras, jeringa de inyección y celda de flujo del citómetro.

#### 11.44.5 Lavado profundo del equipo (Long clean):

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

#### 11.45 Compensación:

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

#### 11.45.1 Establecer línea de base:

 Requiere Soluciones estándar (reactivo Citometer Setup and Traking) para establecer las condiciones óptimas del equipo, en cuanto a las ganancias de luz de emisión en cada canal de detección.

#### 11.45.2 Ajuste de voltajes:

 Requiere de la adquisición de una suspensión de perlas con valores de IFM estándar para establecer los valores de voltajes en cada canal para obtener el punto óptimo de detección en cada PMT (mejor ganancia de luz de emisión de los fluorocromos).

#### 11.45.3 Cálculo de compensación:

 Establecer las restas de compensación en las combinaciones de los 8 canales para evitar el solapamiento del espectro luminoso de la luz de emisión de los fluorocromos, asegurando la lectura apropiada de cada longitud de onda en el canal correspondiente.

#### 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.
  - 2.3 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:

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











JUDITH VIDAL AYLLON Jefa de Citometria de Flujo





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 Fluxo: aplicações no laboratorio 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, In Press.
- 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



घटर्शा

- Anexo N° 01: Panel de anticuerpos para screening de leucemias agudas.
- Anexo N° 02: Panel complementarios de anticuerpos para el estudio de diagnóstico de leucemias agudas.
- Anexo N° 03: Control de cambios y mejoras.





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









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

#### ANEXO N° 01

# PANEL DE ANTICUERPOS PARA SCREENING DE LEUCEMIAS AGUDAS.

profesional designation of the contract of the	SERVICE AND ADDRESS OF THE PROPERTY OF THE PARTY AND	Altere is a managery, non-consultation	and a second and the contract of the contract	
TUBO SCF	REENING	LEUCEMIA	AGUDA	(ALOT)
		<del></del>		\ /

	V450	PO	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
TUBO	cyCD3	CD45	cyMPO	CD79a	CD34	CD19	CD7	smCD3
VOL Rvo	7	5	5	- 5	7	5	2	3

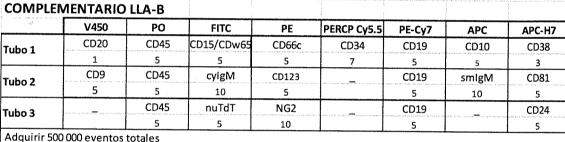
Adquirir 500 000 eventos totales sí por morfología se encontraron 20% ó más de blastos Adquirir 2 500 000 eventos totales sí por morfología se encontraron menos de 20% de blastos

#### ANEXO N° 02

# PANELES COMPLEMENTARIOS DE ANTICUERPOS PARA EL ESTUDIO DE DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS AGUDAS.

# TU TU

OPE-I



Adquirir 2 500 000 eventos totales Adquirir 2 500 000 eventos totales sí por morfología se encontraron menos de 20% de blastos

10



#### Si el estadio es sigM+ complementar con el tubo 3 c V450 V500c FITC PE PERCP Cy5.5 PE-Cy7 APC APC-H7 TUBO 3C smKappa **CD45** nuTdT CD19 CD22 smLambda

#### COMPLEMENTARIO LPA

Adquirir: 100 000 eventos

Vol Rvo



					<u> </u>		NO. 1819/11 A. D. D	
	V450	V500c	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	HLADR	CD45	CD15	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD38
	3	5	10	7	. 10	5	5	3
Tubo 2	HLADR	CD45	CD15	CD56		CD117	CD33	
	3	5	10	5		5	10	
ľubo 3	HLADR	CD45	CD2	CD203c		CD117		
100	3	5	5	10		5	** * ****** ***************************	

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



5ul



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

#### COMPLEMENTARIO LMA M0, M1, M2, M4, M5

Sector Salud

Adquirir: 100 000 eventos

	V450	V500c	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	АРС-Н7	
Tubo 1	HLADR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10	
	3	5	10	7	10	5	5	5	
	HLADR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	IREM2	CD14	
Tubo 2	3	5	5	10	10	5	5	5	
	HLADR	CD45	CD15	CD56	CD34	CD117	CD33	CD38	
Tubo 3	3	5	10	5	10	5	10	3	
		CD45		CD25		CD117	125.00	_	
Tubo 4		5		10		5			

Nota: De no llegar a conclusión diagnóstica se deberá ampliar tubo a tubo con los paneles descritos en ampliaciones M6, M7... Se marcará el tubo 4 cuando se observe ≥0.09% de mastocitos (Adquirir 500 000 eventos viables)

# AMPLIACIONES CASOS M6, M7, BASOFILICAS, DENDRITICAS, MIXTA.

Adquirir: 500 000 eventos viables

Г	V450	V500c	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	HLADR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71
ERITROIDE	3	5	5	5	10	5	5	5
Tubo 2	HLADR	CD45	TdT	NG2	CD34	CD1.17	CD22	
LA MIXTA	3	5	10	10	10	. 5	5	
Tubo 3	HLADR	CD45	CD42a/CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4
CDP/MK/MASTO /BASQ	3	5	3/4	10	10	5	5	5
Tubo 4	HLADR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9
MK/MASTO/ BASO	3	5	5	10	10	5	3	10

Puede marcarse los paneles por partes hasta llegar al diagnóstico

SMD

Adquirir 2 500 000 eventos viables

	V450	V500c	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	АРС-Н7
Tubo 1	HLADR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10
	3	5	10	7	10	5	5	10
	HLADR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	IREM2	CD14
Tubo 2	3	5	5	5	10	5	5	5
	HLADR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71
Tubo 3	3	5	5	10	10	5	10	2
	HLADR	CD45	CD15	CD56	CD34	CD117	CD7	CD38
Tubo 4	3	5	10	5	10	5	2	3

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





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

#### **ANEXO N° 03**

#### **CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

			CONTROL DE CAMBI	OS Y MEJORAS	
SE CONTROL	VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
Verse	11 DCION 01	1 - 17	Se elabora PNT según DA N° 001- 2019-INEN/DICON- DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neopiásicas (Resolución Jefatural N° 276- 2019-J/INEN).	31/08/2020	M.C. Judith Vidal Ayllón





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



......



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

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA PARA LEUCEMIA

#### I. **OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de citometría de flujo para leucemia.

#### II. **IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

Código CPMS (MINSA): 88204

Sector

Salud

Código Tarifario INEN: 210301

#### **ALCANCE** 111.

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de citometría para leucemia 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 seguimiento de leucemias agudas.

#### 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 Fluio: 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.

#### **DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**



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

- Citometría de flujo: La 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)

Anticuerpos monoclonales para Citometría de Flujo: Son anticuerpos producidos por clones de células B y de mieloma llamados "hibridoma" que se unen al mismo epítopo de un antígeno proporcionando así datos altamente específicos. (3.4)



Sector

Salud



#### PNT.DNCC. INEN.141. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CITOMETRÍA PARA LEUCEMIA V.01

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

- 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 aguda: Son neoplasias de células de tejido hematopoyético, inmaduras, pudiendo ser de estirpe mieloide o linfoide B o T. Las leucemias mieloides y linfoblástica B se origina en médula ósea, mientras que la de células T tiene su origen en el timo. Están clasificados en la OMS 2017 dentro de la clasificación de tumores de tejido hematopoyético y tejido linfoide (5)

#### SIGNIFICANCIA CLÍNICA

El diagnóstico por citometría de flujo en pacientes con leucemia aguda tiene tres aplicaciones principales: establecer la categoría diagnóstica de la enfermedad, clasificación pronóstica y efectividad del tratamiento. Desde hace aproximadamente dos décadas el inmunofenotipo por citometría de flujo multiparamétrica ha sido la técnica de elección para el diagnóstico de leucemias, debido a que cumple con los requerimientos para ello: es técnica rápida, de amplia aplicabilidad en el diagnóstico y durante el seguimiento y enfoque preciso en la población de células malignas utilizando proteínas unidas a la membrana e intracelulares como objetivos. (3)

#### VII. EQUIPAMIENTO

MIENT

#### Equipos médico y biomédico:

- Citómetro de Flujo FACS Canto II de 8 colores: V450, V500, FITC, PE, Percy Cv5.5, PE Cv7, APC v APC-H7
- Refrigeradora / conservadora de 4 °C para reactivos en stock. 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.
- Cabina de seguridad biológica-Cámara de bioseguridad clase II.
- Microscopio binocular
- Timer
- Agitador de tubos o vórtex
- Bomba de succión aspiración (con matraz erlenmeyer de vidrio graduado 1L)

#### Equipo Electromecánico: 7.2

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











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

#### 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.
- Contador digital hematológico de células.
- Frasco gotero de vidrio ámbar clase A x 100 mL.
- Bomba de succión aspiración (con matraz erlenmeyer de vidrio graduado 1L).
- Termómetro ambiental.
- Frasco de vidrio graduado 1L con dispensador.
- Piseta de polietileno de 250 µL.
- Mortero de porcelana 250 mL con pilón.
- Matraz para bomba al vacío de 3L.

#### 7.5 Mobiliario:

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

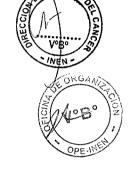
#### VIII. SUMINISTROS

#### Insumos y material:

- Guantes de nitrilo descartables.
- Lentes protectores de policarbonato.
- 1 tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA<sub>K2</sub>
- Punteras descartables de 1000 uL
- 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

#### 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

















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

- 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:

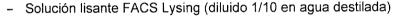
#### a) Fluorocromos:

Ver Anticuerpos, fluorocromos con su respectivo título en anexo N° 1, según panel correspondiente



#### 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
- Agua destilada



#### **SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS**

#### Servicios Técnicos:

#### Mantenimiento preventivo de equipamiento:

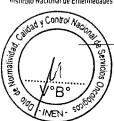
- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos



#### Servicios públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

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







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

#### **MUESTRA** X.

#### 10.1 Obtención de la muestra:

- Médula ósea: es realizado por el área de trabajo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y el Servicio de Procedimientos Especiales del Equipo Funcional de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.
- 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, Sangre periférica.

#### 10.3 Recipiente:

- Tubo con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) dipotásico (K2).

#### 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 fresca.

#### 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.

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

#### 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.











JUDITÀ VIDAL AYLLON





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

Ingresar los datos del paciente al Sistema Administrativo Hospitalario 11.3.3 (SISINEN), e imprimir etiqueta con código de barra.

#### 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:

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

#### Coloración y lectura del frotis de muestra orientación de panel de marcaje: 11.6

- Colorear la muestra, previamente rotulada con lápiz de para marcar vidrio 11.6.1 con el número correspondiente de citometría y las iniciales del nombre del paciente.
- Lectura de la lámina coloreada con wright para obtener la fórmula 11.6.2 diferencial, que servirá para orientar la elección de los paneles de marcaje.

#### Recuento de la celularidad de la muestra: 11.7

Se realiza según instructivo de recuento celular aprobado por el área.

#### 11.8 Preparación del panel de screening:

Ver anexo N° 1 para el panel de marcaje que corresponda. 11.8.1

#### 11.9 Preparación del material para marcaje de la muestra:

El personal Biólogo/a, Tecnólogo/a Médico a cargo debe prever el material 11.9.1 que requiera para el marcaje (tubos, punteras, pipetas, reactivos, soluciones de trabajo y buffer de lavado y adquisición).

#### 11.10 Procesamiento del tubo orientador de leucemias agudas (ALOT)

11.10.1 Preparar en un solo tubo de citometría la combinación de anticuerpos de screening del panel ALOT, colocando cada anticuerpo en volumen apropiado, según el título indicado en el panel (ver anexo N° 1).

#### 11.11 Lavado de la muestra

- 11.11.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% a la muestra.
- 11.11.2 Mezclar bien.
- 11.11.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.11.4 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.

#### 11.12 Fijar la muestra

- Colocar 100 uL de solución fijadora del kit de permeabilización (Solución 11.12.1
- 11.12.2 Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

#### 11.13 Lavar la muestra:

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

11.13.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular

11,13.2 Mezclar bien.

11.13.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.



DEPAR







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

- 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.
- 11.13.5 Reconstituir suavemente el pellet.

#### 11.14 Permeabilizar la muestra

Sector

Salud

- 11.14.1 Colocar 100 de solución permeabilizante (solución B) y mezclar con la muestra por 10 segundos.
- 11.14.2 La solución B contiene también solución lisante para eliminar a los hematies.

## 11.15 Marcaje con anticuerpos intracitoplasmáticos:

11.15.1 Agregar el volumen apropiado de anticuerpos dirigidos contra los marcadores de citoplasma que contiene el panel (CyCD3, CyCD79a, CyMPO)

## 11.16 Centrifugado y lavado para eliminar solución permeabilizante:

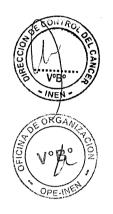
- 11.16.1 Añadir 2 ml de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.16.2 Mezclar bien.
- 11.16.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.16.4 Descarte el sobrenadante usando una pipeta pasteur o un sistema de vacío sin alterar el sedimento celular, dejando aproximadamente 50 µL de volumen residual en cada tubo.
- 11.16.5 Repetir los pasos 11.16.1 al 11.16.4 una vez más

#### 11.17 Reconstituir para la adquisición:

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

## 11.18 Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo:

- 11.18.1 Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4 °C a 8 °C durante 1 h, como máximo.
- 11.18.2 Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisition del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo con un mínimo de 500 000 eventos viables si la muestra tiene una infiltración de 20% o más de blastos ó 2 000 000 de eventos viables si tiene una infiltración de menos de 20% de blastos.
- 11.18.3 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.
- 11.18.4 Análisis de ALOT y elaboración del panel complementario diagnóstico:
- 11.18.5 El informe del resultado es cualitativo.
- 11.18.6 Los resultados obtenidos después de la adquisición serán evaluados por personal capacitado usando el software INFINICYT.
- 11.18.7 Elegir el panel complementario correspondiente, según los hallazgos encontrados en el tubo de screening con la línea hematológica que caracterice a la población inmadura patológica.









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





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

11.18.8 Ver en anexo N° 2 los paneles complementarios para marcaje.

## 11.19 Marcaje del panel complementario de leucemia aguda:

11.19.1 Se procederá al marcaje del panel complementario

### 11.20 Preparación del material para marcaje del panel complementario:

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

#### 11.21 Procesamiento de tubos con marcaje de antígenos de superficie:

11.21.1 En esta sección se indica el marcaje de la muestra con los anticuerpos dirigidos solo antígenos de superficie.

## 11.22 Marcaje de muestra con antígenos de superficie

11.22.1 Preparar la rnezcla de muestra + anticuerpos, en los tubos a los que les corresponde solo marcadores de superficie, según el panel complementario (ver anexo N° 2) en los tubos de citometría rotulados con el número de tubo según indique el panel complementario con la combinación de anticuerpos superficie.

#### 11.23 Incubación de la Muestra con Lisante de Hematies Registro en SISINEN:

- 11.23.1 Añadir 2 mL de 1x FACS Lysing Solution (10x FACS Lysing Solution diluido 1/10 vol / vol en agua destilada (H2Od).
- 11.23.2 Mezclar bien.
- 11.23.3 Incubar durante 10 min a temperatura ambiente protegido de la luz

#### 11.24 Lavar la Muestra.

- 11.24.1 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.24.2 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.
- 11.24.3 Reconstituir suavemente el pellet
- 11.24.4 Añadir 2 ml de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11,24.5 Mezclar bien.
- 11.24.6 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.24.7 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.

#### 11.25 Reconstitución para la adquisición

11.25.1 Reconstituir suavemente el pellet y agregar luego aproximadamente 250 µL de solución de adquisición (PBS)











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







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

## 11.26 Adquisición de la Muestra en el Citómetro de Flujo

- Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4 °C a 8 °C durante 1 h, como máximo.
- 11.26.2 Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisition del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo con un mínimo de 500 000 eventos viables si la muestra tiene una infiltración de 20% o más de blastos ó 2 000 000 de eventos viables si tiene una infiltración de menos de 20% de blastos

## 11.27 Procesamiento del tubo con marcaje de antígenos de citoplasma o núcleo

11.27.1 En esta sección se indica el marcaje de la muestra con los anticuerpos dirigidos solo antígenos de citoplasma o núcleo.

## 11.28 Marcaje de la muestra con anticuerpos de superficie

- 11.28.1 Preparar la mezcla de muestra + anticuerpos en los tubos a los que les corresponde marcaje combinado de marcadores de superficie, citoplasma y núcleo, según el panel complementario (ver anexo  $N^{\circ}$  2) en los tubos de citometría rotulados con el número de tubo según indique el panel complementario. Colocar la combinación indicada de anticuerpos contra antígenos de superficie y el volumen de muestra obtenido en el recuento de celularidad.
- 11.28.2 Incubar por 20 minutos en oscuridad y temperatura ambiente.

#### 11.29 Lavado de la muestra:

- 11.29.1 Añadir 2 ml de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.29.2 Mezclar bien.
- 11.29.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.29.4 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.

## 11.30 Fijación de la muestra

- 11.30.1 Colocar 100 µL de solución fijadora del kit de permeabilización (Solución A) y mezclar bien.
- 11.30.2 Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad

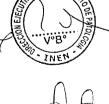
#### 11.31 Lavar de la muestra

- 11.31.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.31.2 Mezclar bien.
- 11.31.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 11.31.4 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.
- 11.31.5 Reconstituir suavemente el pellet



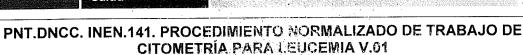






JUDITH VIDAL AYLLON Jefa de Citometria de Flujo CMP 14344 RNE, 14141 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas





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

### 11.32 Permeación y lisis de la muestra

- 11.32.1 Colocar 100 de solución permeabilizante (solución B) y mezclar con la muestra por 10 segundos.
- 11.32.2 La solución B contiene también solución lisante para eliminar a los hematíes.

## 11.33 Marcaje de la muestra con anticuerpos intracitoplasmáticos:

11.33.1 Agregar el volumen apropiado de anticuerpos dirigidos contra los marcadores de citoplasma que contiene el panel (CyCD3, CYCD79a, CyMPO)

## 11.34 Centrifugado y lavado para eliminar solución permeabilizante:

- 11.34.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.34.2 Mezclar bien.
- 11.34.3 Centrifugar durante 5 min.a 540 g.
- 11.34.4 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.

#### 11.35 Lavado de muestra

- 11.35.1 Añadir 2 mL de PBS + BSA al 0,2% + NaN3 al 0,09% al sedimento celular
- 11.35.2 Mezclar bien.
- 11.35.3 Centrifugar durante 5 min a 540 g.
- 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.

#### 11.36 Reconstitución para la adquisición:

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

## 11.37 Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo:

- 11.37.1 Adquirir las células inmediatamente después del marcaje, de no ser posible, almacenar entre 4 °C a 8 °C durante 1 h. como máximo.
- 11.37.2 Colocar el tubo de muestra en la pipeta de inyección del citómetro (SIT) y programar la adquisición en el "Dashboard Adquisition del programa de adquisición (DIVA software) y grabar los datos para formar el archivo con un mínimo de 500 000 eventos viables si la muestra tiene una infiltración de 20% o más de blastos ó 2 000 000 de eventos viables si tiene una infiltración de menos de 20% de blastos.

#### 11.38 Análisis y Elaboración del pre-informe:

- 11.38.1 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/agosto, 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.
- 11.38.2 El informe del resultado es cualitativo.











JUDITH VIDAL AYLLON

Jefa de Citometria de Flujo

CMP 14344 RNE 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas







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

- 11.38.3 Los resultados obtenidos después de la adquisición serán evaluados por personal capacitado usando el software INFINICYT.
- 11.38.4 Elaborar el correspondiente Informe como archivo power point / ppt.
- 11.38.5 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.

## 11.39 Análisis y Elaboración del informe final:

11.39.1 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.

#### 11.40 Registro de informe en SISINEN:

Sector

Salud

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

#### 11.41 Validación e impresión de informe:

- 11.41.1 A cargo del personal médico patólogo encargado. Requiere de usuario y contraseña propios en SISINEN.
- 11.41.2 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.
- 11.41.3 Los informes copiados en el sistema informático SISINEN son validados por el personal médico responsable.
- 11.41.4 En el sistema SISINEN también se puede validar o corregir resultados discordantes.

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

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

## 11.43 Registro de estadísticas por tipo de caso:

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

#### 11.44 Mantenimiento:

#### Mantenimiento diario:

Consiste en los pasos de lavados matutinos y entre la adquisición de tubos para evitar interferencias y ruido de fondo en los archivos fcs. Adicionalmente se utilizará una solución estándar con targets conocidos para la calibración de los equipos.

#### 11.44.1 Lavado de equipo:

- Diariamente, al iniciar la jornada de trabajo, se procederá con el encendido y lavado de equipo con detergentes surfactantes especiales para la limpieza de las tubuladuras y celdas del citómetro y se procederá con el encendido electrónico del citómetro de flujo con la función "Start up".
- Luego se procederá al enjuague con varias corridas de agua destilada.









JUDITH VIDAL AYLLON
Jefa de Çitometria de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141
Instituto Nacional de Enfermedades Neoglásicas









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

#### 11.44.2 Calibración de equipo

- Para este paso se requiere adquirir en el citómetro una suspensión de perlas con valores estándar de Intensidad de fluorescencia media.
- Los targets de las perlas de cada canal establecerán en el equipo los reajustes de voltajes (delta o diferencial de PMT) y otros valores que impactarán de manera positiva en las adquisiciones de cada experimento en el citómetro y tiene validez por 24 horas, transcurrido este tiempo caducará y deberá repetirse la calibración.

#### 11.44.3 Control v seguimiento de voltaje

 En el templado del software de adquisición (plantilla de trabajo con las condiciones de adquisición grabadas) se revisará diariamente si la solución estándar (control de estandarización) coincide en las intensidades de fluorescencia media (IFM) de cada canal con los IFM que se dejaron grabados el día de la compensación en la "plantilla ajuste de voltajes".

#### 11.44.4 Lavado final diario para mantenimiento de equipo

- Diariamente, al terminar la jornada de trabajo, se procederá con el encendido y lavado de equipo con detergentes surfactantes especiales para la limpieza de las tubuladuras y celdas del citómetro y se procederá con el apagado electrónico del citómetro de flujo con la función "shutdown"
- Luego se procederá al enjuague con varias corridas de agua destilada.

#### Mantenimiento semanal

Se realiza una vez por semana para liberar de impurezas y sedimentos de sales a las tubuladuras, jeringa de invección y celda de flujo del citómetro.

## 11.44.5 Lavado profundo del equipo (Long clean)

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

#### 11.45 Compensación:

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

#### 11.45.1 Establecer línea de base

 Requiere soluciones estándar (reactivo Citometer Setup and Traking) para establecer las condiciones óptimas del equipo, en cuanto a las ganancias de luz de emisión en cada canal de detección.









INER





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

#### 11.45.2 Ajuste de voltajes

Requiere de la adquisición de una suspensión de perlas con valores de IFM estándar para establecer los valores de voltajes en cada canal para obtener el punto óptimo de detección en cada PMT (mejor ganancia de luz de emisión de los fluorocromos)

#### 11.45.3 Cálculo de compensación

Establecer las restas de compensación en las combinaciones de los 8 canales para evitar el solapamiento del espectro luminoso de la luz de emisión de los fluorocromos, asegurando la lectura apropiada de cada longitud de onda en el canal correspondiente.



- 12.1 El ir forme 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 marca lor evaluado, en un sistema de escala en cruces.

Para e to habrá 2 opciones:

- o Pos. vo débil (-/+), (+d)
- Posi vo intenso (++); (+++)

### XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Sales M, Moraes-Vasconcelos D (Eds), Duarte A. Citometría de Fluxo: aplicações no laboratorio clínico e de pesquisa. Sao 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.
- 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

XIV. ANEXOS

Anexo N° 01: Panel de anticuerpos para screening de Leucemias agudas.

45

- JUDITH VIDAL AYLLON. Anexo N° 02: Panel complementarios de anticuerpos para el estudio de diagnóstico de Leucemias agudas.
  - Anexo N° 03: Control de cambios y mejoras.



Jefa de Citometria de Flujo CMP 14344 RNE. 14141





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

#### ANEXO N° 01

## PANEL DE ANTICUERPOS PARA SCREENING DE LEUCEMIAS AGUDAS





TUBO SCREENING LEUCEMIA AGUDA (ALC) 1)									
	V450	PO	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	
TUBO	cyCD3	CD45	суМРО	CD79a	CD34	CD19	CD7	smCD3	
VOL Rvo	7	5	5	5	7	5	2	3	

Adquirir 500 000 eventos totales sí por morfología se encontraron 20% ó más de blastos Adquirir 2 500 000 eventos totales sí por morfología se encontraron menos de 20% de blastos







JUDITH WIDAL AT LLON

Jefa de Citometria de Flujo

CMP 14344 RNE. 14141

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas





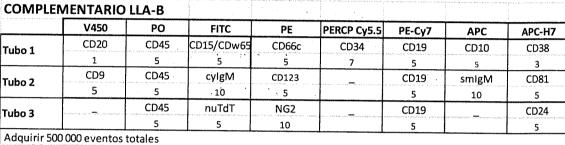


Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

#### ANEXO N° 02

## PANELES COMPLEMENTARIOS DE ANTICUERPOS PARA EL ESTUDIO DE DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS AGUDAS

A	ESONIA	CORE!
STECOOK STATE	A)	SEL CANO
	V <sub>B</sub> °	/3]
(\$)	E ORGA	PE -
OFICINA A	VABO	JON I



Adquirir 2 500 000 eventos totales sí por morfología se encontraron menos de 20% de blastos

Si el estadio es sigM+ complementar con el tubo 3 c

	V450	V500c	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
TUBO 3C	smKappa	CD45	nuTdT		_	CD19	CD22	smLambda
Vol Rvo	5	5	10			5	5ul	5



#### COMPLEMENTARIO LPA

Adquirir: 100 000 eventos

	V450	V500c	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	HLADR	CD45	CD15	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD38
10001	3	5	10	7	10	5	5	3
Tubo 2	HLADR	CD45	CD15	CD56		CD117	CD33	
I GDO Z	3	5	10	5	The first of the second reserve of the second for t	5	10	Probables States and a Source consulting
Tubo 3	HLADR	CD45	CD2	CD203c		CD117		
	3	5	5	10		5		



## COMPLEMENTARIO LMA M0, M1, M2, M4, M5

Adquirir: 100 000 eventos



***************************************	V450	V500c	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	HLADR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10
10001	3	5	10	7	10	5	5	5
Tuba 2	HLADR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	IREM2	CD14
	3	5	5	10	10	5	5	5
Tubo 3	HLADR	CD45	CD15	CD56	CD34	CD117	CD33	CD38
	3	5	10	5	10	5	10	3
Tubo 4		CD45		CD25		CD117	faya da ja	
i diboji		5		10		. 5		-

Nota: De no llegar a conclusión diagnóstica se deberá ampliar tubo a tubo con los paneles descritos en ampliaciones M6, M7... Se marcará el tubo 4 cuando se observe ≥0,09% de mastocitos (Adquirir 500 000 eventos viables)

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

Instituto Nacional de Enfermedades Neoptasio







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

## AMPLIACIONES CASOS M6, M7, BASOFILICAS, DENDRITICAS, MIXTA.

Adquirir: 500 000 eventos viables

Γ	V450	V500c	FITC	PE.	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H
Tubo 1	HLADR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71
ERITROIDE	3	5	5	5	10	5	5	5
Tubo 2	HLADR	CD45	TdT	NG2	C034	CD117	CD22	İ
LA MIXTA	3	5	10	10	10	5	5	
Tubo 3	HLADR	CD45	CD42a/CD61.	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4
CDP/MK/MASTO /BASO	3	5	3/4	. 10	10	5	5	5
Tubo 4	HLADR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9
MK/MASTO/ BASO	3	5	5	10	10	5	3	10

Puede marcarse los paneles por partes hasta llegar al diagnóstico





#### **SMD**

Adquirir 2 500 000 eventos viables

V450	V500c	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
HLADR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10
3	5	10	7	10	5	5	10
HLADR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	IREM2	CD14
3	5	5	5	10	5	5	5
HLADR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71
3	5	5	10	10	5	10	2
HLADR	CD45	CD15	CD56	CD34	CD117	CD7	CD38
3	5	10	5	10	5	2.	3
	HLADR 3 HLADR 3 HLADR 3 HLADR	HLADR CD45 3 5 HLADR CD45 3 5 HLADR CD45 3 5 HLADR CD45 3 5	HLADR CD45 CD16 3 5 10 HLADR CD45 CD35 3 5 5 HLADR CD45 CD36 3 5 5 HLADR CD45 CD36 3 5 5 HLADR CD45 CD15	HLADR CD45 CD16 CD13  3 5 10 7  HLADR CD45 CD35 CD64  3 5 5 5  HLADR CD45 CD36 CD105  3 5 5 10  HLADR CD45 CD36 CD105  HLADR CD45 CD15 CD56	HLADR CD45 CD16 CD13 CD34  3 5 10 7 10  HLADR CD45 CD35 CD64 CD34  3 5 5 5 10  HLADR CD45 CD36 CD105 CD34  3 5 5 5 10  HLADR CD45 CD36 CD105 CD34  3 5 5 5 10 10  HLADR CD45 CD15 CD56 CD34	HLADR CD45 CD16 CD13 CD34 CD117  3 5 10 7 10 5  HLADR CD45 CD35 CD64 CD34 CD117  3 5 5 5 10 5  HLADR CD45 CD36 CD105 CD34 CD117  3 5 5 5 10 5  HLADR CD45 CD36 CD105 CD34 CD117  3 5 5 5 10 10 5  HLADR CD45 CD15 CD56 CD34 CD117	HLADR CD45 CD16 CD13 CD34 CD117 CD11b 3 5 10 7 10 5 5 HLADR CD45 CD35 CD64 CD34 CD117 IREM2 3 5 5 5 10 5 5 HLADR CD45 CD36 CD105 CD34 CD117 CD33 3 5 5 10 10 5 10 HLADR CD45 CD36 CD105 CD34 CD117 CD33 4 5 5 10 10 5 10 HLADR CD45 CD15 CD56 CD34 CD117 CD7

## COMPLEMENTARIO LLA-T

	V450	V500c	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo 1	cyCD3	CD45	nuTdT	CD99	CD5	CD10	CD1a	smCD3
	7	5	10	5	10	5	5	3
Tubo 2	cyCD3	CD45	CD2	CD117	CD4	CD8	CD45RA	smCD3
	7	5	5	5	7	- 5	5	3
	cvCD3	CD45	TCRgd	TCRab	CD33	CD56	CD123	smCD3
Tubo 3	7	5	10	7	10	5	5(dil)	3
Tubo 4	cvCD3	CD45		CD13		HLADR	CD64	smCD3
	7	5		7		3	5	3

Adquirir 500 000 eventos si el número de blastos es 20% ó más. Adquirir 2 500 000 eventos si el número de blastos es menor de 20%

JUDITH VIDAL AYLLON Jefa de Citometria de Flujo CMP 14344 RNE. 14141 instituto Nacional de Enfermedades Neoplasicas





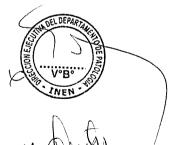
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Citometría de Flujo

## ANEXO N° 03

### **CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

			CONTROL DE CAMBI	OS Y MEJORAS	
SE CONTROLO	VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
V°B°  INEN- ORGANIZA OPE-NIE	CANC 01	1 - 17	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).	31/08/2020	M.C. Judith Vidal Ayllón





JUDITH VIDAL AYLLON
Jefa de Citometria de Flujo
CMP 14344 RNE. 14141
instituto Nacional de Entermedades Neoplásicas

