



Nº 49 -2024-DG-INSN

RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Lima, 09 de Febrero del 2024



Visto, el expediente con Registro DG-001385-2024, que contiene el Memorando N° 006-DEIDADT-INSN/2024 mediante el cual se adjunta el Documento Técnico: "GUÍA TÉCNICA: PROCEDIMIENTO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA DETECCIÓN DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA", elaborada por el Servicio de Hematología.

CONSIDERANDO:

Que, los numerales II y VI del Título Preliminar de la Ley N° 26842, Ley General de Salud, se establecen que la protección de la salud es de interés público y por tanto es responsabilidad del Estado regularla, vigilarla y promoverla;

Que, los literales c) y d) del Artículo 12° del Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud del Niño, aprobado por Resolución Ministerial N° 083-2010/MINSA, contemplan dentro de las funciones de la Oficina de Gestión de la Calidad el de implementar las normas, estrategias, metodologías e instrumentos de la calidad para la implementación del Sistema de Gestión de la Calidad, y asesorar en la formulación de normas, guías de atención y procedimientos de atención al paciente;



Que, mediante Memorando N° 006-DEIDADT-INSN/2024, la Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento remite a la Oficina de Gestión de la Calidad el Documento Técnico: "GUÍA TÉCNICA: PROCEDIMIENTO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA DETECCIÓN DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA", elaborado por el Servicio de Hematología.



Que, con Memorando N° 040-2024-DG/INSN, de fecha 18 de enero del 2024, la Dirección General aprueba el Documento Técnico: "GUÍA TÉCNICA: PROCEDIMIENTO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA DETECCIÓN DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA", elaborada por el Servicio de Hematología; y autoriza la elaboración de la resolución correspondiente;

Con la opinión favorable de la Dirección General, la Oficina de Gestión de la Calidad, Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento y la Visación de la Oficina de Asesoría Jurídica del Instituto Nacional de Salud del Niño, y;

De conformidad con lo dispuesto en la Ley N° 26842, Ley General de Salud, y el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud del Niño, aprobado con Resolución Ministerial N° 083-2010/MINSA;

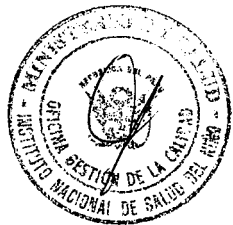


SE RESUELVE:

Artículo 1°.- Aprobar el Documento Técnico: "GUÍA TÉCNICA: PROCEDIMIENTO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA DETECCIÓN DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA", que consta de 22 páginas, elaborado por el Servicio de Hematología del Instituto Nacional de Salud del Niño.

Artículo 2°.- Encargar a la Oficina de Estadística e Informática, la publicación del Documento Técnico: "GUÍA TÉCNICA: PROCEDIMIENTO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA DETECCIÓN DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA", en la página web Institucional.

Regístrese, Comuníquese y Publíquese.



MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
M.C. CARLOS URBANO DURAND
DIRECTOR GENERAL
E.M.P. 18718 = R.N.E. 18686

**CLUD/REK
DISTRIBUCIÓN**

- () DG
- () DA
- () DEIDADT
- () OEI
- () OAJ
- () OGC



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO

GUÍA TÉCNICA: PROCEDIMIENTO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA DETECCIÓN DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA

SERVICIO DE HEMATOLOGÍA

DICIEMBRE - 2023

**MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO**

.....
Dra. Dina Marleni Olave Quispe
PATOLOGO CLINICO
JEFE DEL SERVICIO DE HEMATOLOGIA
CMP. 53416 RNE. 28167

**MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO**

.....
M.C. LILIAN PATIÑO GABRIEL
Jefe (e) del Departamento de Investigación
Docencia y Atención en Patología
CMP N° 28863 RNE N° 14573 RNA N° A6146

ÍNDICE

I.FINALIDAD	3
II.OBJETIVO	3
III.ÁMBITO DE APLICACIÓN	3
IV.PROCESO O PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	3
V.CONSIDERACIONES GENERALES	3
5.1.POBLACIÓN OBJETIVO	3
5.2.PERSONAL QUE INTERVIENE	3
5.3.MATERIAL	3
5.4.ASPECTOS TÉCNICOS CONCEPTUALES	5
5.5.DEFINICIONES OPERATIVAS	7
VI.CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	8
6.1.ACTIVIDADES DE VALORACIÓN	8
6.2.PREPARACIÓN DEL MATERIAL	8
6.3.PREPARACIÓN DEL PACIENTE	8
6.4.EJECUCIÓN	9
6.5.PRECAUCIONES	10
6.6.RECOMENDACIONES	10
6.7.EVALUACIÓN	11
VII.RESPONSABILIDADES	12
VIII.ANEXOS	12
8.1.CONSENTIMIENTO INFORMADO	13
8.2.ESTRUCTURA DE COSTOS	15
8.3.FICHA DE NOTIFICACIÓN DE INCIDENTES Y EVENTOS ADVERSOS	15
8.4.PARTICIPANTES EN LA ELABORACIÓN DE LA GUÍA TÉCNICA	16
8.5.DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERESES	17
8.6.INSUMOS, EQUIPOS BIOMÉDICOS Y/O MEDICAMENTOS UTILIZADOS	17
8.7.PANEL DE ANTICUERPOS	20
8.8.FORMATO DE INFORME DE RESULTADOS	20
8.9.FORMATO DE HOJA DE TRABAJO	21
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

I. FINALIDAD

Estandarizar el procesamiento del estudio de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) mediante citometría de flujo.

II. OBJETIVO

- Describir la técnica de procesamiento de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna mediante citometría de flujo.

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

La presente guía de procedimiento es de aplicación y cumplimiento por parte del personal que labora en el área de Citometría de flujo del Servicio de Hematología - Departamento de Investigación, Docencia y Atención en Patología en del Instituto Nacional de Salud del Niño –Breña.

IV. PROCESO O PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

NOMBRE: Citometría de flujo para detección de HPN **CPMS:** 88185.01

V. CONSIDERACIONES GENERALES**5.1. POBLACIÓN OBJETIVO**

Muestras sanguíneas de pacientes pediátricos desde los cero hasta los 17 años 11 meses 3 semanas y 6 días quienes acudan al INSN – Breña con solicitud de análisis de laboratorio y requerimiento de estudio de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna por citometría de flujo.

* Excepcionalmente se atenderá solicitudes de personal que labora en el INSN – Breña.

5.2. PERSONAL QUE INTERVIENE

Médico Patólogo clínico, Tecnólogo Médico en laboratorio clínico, técnico de laboratorio.

5.3. MATERIAL**❖ Equipos Biomédicos**

- Citómetro de flujo de 8 colores.
- Agitador de tubos tipo vortex.
- Micropipeta de 1 – 10 ul
- Micropipeta de 10 – 100 ul
- Micropipeta de 100 – 1000 ul
- Conservadora de reactivos
- Centrifuga para tubos.
- Reloj de tiempo con alarma.

❖ Instrumental

No aplica

❖ Insumos Médicos

- 1 tubo para extracción de sangre con sistema de vacío de polipropileno de 3 mL con EDTA dipotasico.
 - 1 aguja descartable 20G x 1"
 - 1 par guantes de nitrilo para examen descartable talla M
 - Lentes protectores de policarbonato.
 - Papel bond 80 gr tamaño A4
 - Punteras descartables de 1 – 10 ul.
 - Punteras descartables de 10 – 100 ul.
 - Punteras descartables de 100 – 1000 ul.
 - Tubos para citometría de flujo de 12 x 75 mm.
 - Gradilla para tubos de 12 x 75 mm.
 - Otros:
- Reactivos de laboratorio

SOLUCIÓN	PRESENTACIÓN	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN	TEMPERATURA DE USO	VIDA UTIL DESPUES DE ABIERTO
Solución tampón (buffer) para citometría de flujo	20 L	20 – 30 °C	20 – 30 °C	Hasta su término
Solución de limpieza para citómetro de flujo	5 L	20 – 30 °C	20 – 30 °C	Hasta su término
Solución shut down	5 L	20 – 30 °C	20 – 30 °C	Hasta su término
Solución lisante de glicol dietileno y formaldehído 10x	Frasco 100 mL	20 – 25 °C	20 – 25 °C	1 mes
Solución TAMPÓN (buffer) r PBS	1 L	2 – 8 °C	20 – 25 °C	Hasta fecha de vencimiento.
Albúmina bovina	50 gr.	2 – 8 °C	20 – 25 °C	Hasta fecha de vencimiento
Azida sódica	Frasco por 25 gr.	20 – 25 °C	20 – 25 °C	Hasta fecha de vencimiento

REACTIVO	PRESENTACIÓN	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN	TEMPERATURA DE USO	VIDA UTIL DESPUES DE ABIERTO
Anticuerpo monoclonal CD 16/v450	Envase 0.5 ml	2 - 8 °C	15 – 30°C	Hasta fecha de vencimiento
Anticuerpo monoclonal CD 45 con pacif orange/v 500	Envase 0.5 ml			
Aerolisina fluorescente	Envase 1 ml			
Anticuerpo Monoclonal CD 157 Con Ficoeritrina	Envase 1 ml			
Anticuerpo monoclonal CD 33 con peridina proteina clorofila y cianina 5.5	Envase 0.5 ml			
Anticuerpo Monoclonal CD 10 Con Ficoeritrina-Cianina 7	Envase 0.5 ml			
Anticuerpo Monoclonal Cd 64 Con Alloficocianina	Envase 0.25 ml			
Anticuerpo Monoclonal CD 14 Con Alloficocianina-H7	Envase 0.5 ml			

❖ Productos Farmacéuticos

No aplica

5.4. ASPECTOS TÉCNICOS CONCEPTUALES

5.4.1. PRINCIPIO

La Hemoglobinuria Paroxística Nocturna es un trastorno hemolítico adquirido causado por una mutación somática y clonal del gen PIG-A de la célula madre hematopoyética en la síntesis de glucosilfosfatidilinositol. (GPI), haciendo que la carencia parcial o total de las proteínas de membrana ancladas a través del GPI provoque una sensibilidad anormal al complemento, produciéndose hemólisis y activación plaquetaria. (3) (5)

5.4.2. MÉTODO

Utiliza el método de citometría de flujo con láser de 8 colores para la identificación de células deficitarias en GPI, basándose en la ausencia de dos marcadores GPI-ligados o la ausencia de un marcador GPI-ligado y FLAER en población granulocito neutrófilos y monocito. (3)

5.4.3. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

- Verificación de precisión y veracidad del citómetro de flujo con Protocolo CLSI EP15-A3.

5.4.4 TIPO DE MUESTRA

SISTEMA BIOLÓGICO: Médula Ósea anticoagulada con EDTA K2.

5.4.5. CONTROLES AMBIENTALES

Las instalaciones permiten el correcto desempeño de los análisis, a través de adecuadas fuentes de energía, iluminación, ventilación, agua, disposición de residuos y condiciones ambientales.

Especificaciones del analizador:

- Temperatura ambiente: entre 16 y 31°C.
- Humedad relativa: entre 20 y 80%.
- Alimentación eléctrica:
Citómetro: 100/115/230V (50 / 60 Hz)

El control ambiental del área donde se encuentra el analizador se realizará con termohigrometro calibrado. (La calibración la realiza un laboratorio acreditado por INACAL en el estándar ISO 17025)

Al ingreso de un nuevo citómetro se debe verificar y modificar de ser necesarias las condiciones eléctricas para cumplir por lo requerido por el fabricante.

5.4.6. CONTROL DE CALIDAD

- **CONTROL DIARIO DE CALIBRACIÓN:** Con perlas calibradoras para citometría de flujo de 8 colores x 150, perlas calibradoras para citometría de flujo de 8 colores x 25, sangre lisada.
- **CONTROL DE CALIDAD EXTERNO:** Se realiza a través de programas de ensayos de aptitud o programas de evaluación externa de la calidad. *Ver Procedimiento de Control de Calidad Externo, Análisis del Control de calidad externo.*

5.4.7. PROCEDIMIENTOS DE CALIBRACIÓN

El procedimiento de estandarización y compensación del citómetro se realiza entrando al programa FASC DIVA.

Se realiza en las siguientes ocasiones:

- Una vez al mes.
- Cada vez que se generen nuevos ajustes de aplicación.
- Cada vez que se use un nuevo lote de perlas calibradoras para citometría de flujo de 8 colores x 25 para generar ajustes de la aplicación.
- Cada vez que se defina una nueva línea de base mediante perlas calibradoras para citometría de flujo de 8 colores x 150.
- Después de realizar mantenimiento del citómetro.

(Ver Instructivo de Calibración y compensación mensual citómetro de flujo)

5.4.8. INTERFERENCIAS

- No usar muestras de paciente previamente fijadas y almacenadas más de 48 horas, preferible trabajar con muestras frescas.

- Las muestras obtenidas de pacientes tratados con medicamentos inmunosupresores pueden ofrecer una escasa diferenciación.
- Las muestras hemolizadas deben rechazarse.

5.4.9. PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO PARA CALCULAR LOS RESULTADOS

Según recomendaciones de grupo experto en software Infinicyt, última versión, seleccionando los tubos adquiridos del paciente en estudio.

5.4.10. INCERTIDUMBRE

No aplica.

5.4.11. INTERVALOS DE REFERENCIA BIOLÓGICOS O VALORES DE DECISIÓN CLÍNICA

Negativo: No se identifica presencia de clonas HPN en neutrófilos y monocitos

5.4.12 INTERVALO VÁLIDO PARA INFORMAR LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS

No aplica.

5.5. DEFINICIONES OPERATIVAS

- **Aerolisina:** Variante inactiva conjugada con fluorocromo de la proteína formadora de canales aerolisina, de origen bacteriano, que se une específicamente a los anclajes GPI. (1)
- **Citometría de flujo:** Es una metodología que permite detectar de manera simultánea múltiples características físicas de células individuales a una alta velocidad. Células en suspensión que fluyen en una sola fila a través de una zona iluminada por un láser. En este punto, las células dispersan la luz y emiten fluorescencia que es recolectada y transformada en valores digitales almacenados en una computadora. La luz dispersada da información de las características de tamaño y granularidad, mientras que al incidir el láser sobre las células marcadas excita distintos fluorocromos y emiten fluorescencia con longitudes de onda que serán detectadas por fotodetectores. (2)
- **Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN):** es una enfermedad clonal de las células progenitoras hematopoyéticas que se origina por la mutación adquirida del gen PIG-A (fosfatidil-inositol-glucano A), situado en el brazo corto del cromosoma X1. Como consecuencia de dicha mutación, no se sintetiza el grupo de anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) necesario para que numerosas proteínas de membrana se fijen en la superficie celular. Dentro de estas proteínas se encuentran el inhibidor de lisis reactiva de la membrana MIRL (CD59) y el factor acelerador de la degradación del complemento DAF (CD55), ambos inhibidores fisiológicos de la activación del complemento. Como consecuencia de este déficit, las células

hemáticas son más sensibles a la acción lítica del complemento, produciéndose hemólisis y activación plaquetaria entre otros efectos. (3)

La HPN se caracteriza por una hemólisis intravascular, con tendencia a la anemia y trombosis, y un componente variable de insuficiencia medular. (4)

VI. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

6.1. ACTIVIDADES DE VALORACIÓN

Un resultado confiable depende de una adecuada toma de muestra, transporte y recepción de la misma, que cumpla con las condiciones pre analíticas para su procesamiento.

NOMBRE DEL ANÁLISIS	CONDICIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA	TOMA DE MUESTRA			CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA		PROCESAMIENTO
		TIPO DE MUESTRA	TIPO DE CONTENEDOR	VOLUMEN DE MUESTRA	Estabilidad del analito Conservar	Se puede conservar la muestra (seroteca, hemoteca, a T°) por cuantos días.	FRECUENCIA Y DÍAS DE PROCESAMIENTO
CITOMETRÍA DE FLUJO PARA DETECCIÓN DE HPN	NO ayuno, no reposo, indicar si consume medicamentos	Aspirado o Médula ósea	Tubo con EDTA K2	3 mL	Hasta 48 horas a T° ambiente		Lunes a sábado de 8.00 a 14.00 horas.

FUENTE: Listado de Condiciones pre analíticas.

6.2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL

- Verificar condiciones ambientales del área.
- Verificar las condiciones de reactivos en uso y stock, así como los desechos.
- Encender el citómetro.
- Verificar la operatividad de la impresora.
- Realizar y registrar el mantenimiento diario y/o semanal y/o mensual según protocolo.
- Realizar el control de calidad interno correspondiente: perlas calibradoras para citometría de flujo de 8 colores x 150 / perlas calibradoras para citometría de flujo de 8 colores x 25, Sangre Lisada.
- Validar los resultados de control interno.

6.3. PREPARACIÓN DEL PACIENTE

No aplica

6.4. EJECUCIÓN

a. Actividad 1: Recepción de muestras en el laboratorio de hematología.	2 minuto
Verificar datos auditados y generar código de barras en programa LABONET.	1 minuto
Registrar solicitud de paciente en formato de registro y entrega de resultados citometría de flujo: leucemias	1 minuto
b. Actividad 2: Procesamiento de la muestra	9.5 minutos
Realizar recuento de la celularidad de la muestra.	3 minutos
En un tubo de 12 x 75 mm, colocar el volumen requerido de cada anticuerpo monoclonal más el volumen necesario de la muestra. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.	3 minuto
Colocar 2 ml de solución lisante diluida (1/10) e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.	1 minuto
Centrifugar por 5 minutos a 540 gravedades, decantar sobrenadante con pipeta y resuspender el botón celular.	30 seg
Colocar 2 ml de buffer PBS de lavado y centrifugar por 5 minutos a 540 gravedades, decantar sobrenadante con pipeta y resuspender el botón celular con 200 uL de buffer de adquisición.	2 minuto
c. Actividad 3: Adquisición en el Citómetro Ver instructivo de procesamiento de HPN por citometría de flujo.	5 minutos
d. Actividad 4: Análisis de datos y elaboración de informe final	30 minutos
Analizar los datos adquiridos en el programa Infinicyt, seleccionando los tubos adquiridos del paciente según el código interno asignado. El análisis será realizado por personal capacitado (médico patólogo clínico).	15 minutos
El informe final se efectúa en una Plantilla en PPT Anexo1 Cuantitativo: Las poblaciones descritas serán reportadas en porcentaje. Cualitativas: Los fenotipos (datos) son reportados como "negativo" si la población descrita no expresa el marcador evaluado. Los fenotipos (datos) son reportados como "positivo", si la población descrita expresa el marcador evaluado. La intensidad de la expresión del marcador se expresará en cruces, desde +/- hasta +++.	15 minutos

Entrega de resultados

- Los resultados de los pacientes de la Institución serán cargados al sistema Labonet en formato pdf. Y se entregarán en físico a la secretaría del Servicio de Hematología para su registro y entrega de resultados.
- Los resultados de los pacientes de instituciones externas se entregarán en físico a la secretaría del Servicio de Hematología para su registro y entrega de resultados.

Archivo de resultados

- La data virtual del Citómetro será almacenada en Discos Duros (1 en área de procesos y 1 en sala de análisis).
- Los informes de los pacientes de la institución serán almacenados de manera física y virtual.

6.5. PRECAUCIONES

6.5.1. CONTROLES DE SEGURIDAD

Los controles de bioseguridad se dan conforme al Instructivo de "Segregación de residuos" con informe mensual.

- No se trabaja con reactivos vencidos
- No se mezclan reactivos.

6.6. RECOMENDACIONES

6.6.1. INSTRUCCIONES PARA DETERMINAR RESULTADOS CUANTITATIVOS CUANDO UN RESULTADO NO ESTA DENTRO DEL INTERVALO DE MEDIDA.

No aplica

6.6.2. OTRAS

- Conservar los anticuerpos tapados y a temperatura de 2° a 8°C cuando no se use.
- Proteger los anticuerpos del congelamiento, de temperaturas por encima de 30°C y de tiempo prolongado a temperatura ambiente (18° a 26°C).
- No usar los anticuerpos si se observa algún cambio en su apariencia, la precipitación o decoloración indica inestabilidad o deterioro.
- Los anticuerpos contienen azida de sodio como preservante, sin embargo, se debe tener cuidado que una contaminación microbiana pueda ocurrir, la cual podría ocasionar resultados erróneos.

- Todas las muestras biológicas y materiales en contacto con ellos deben considerarse peligrosos, se debe tener las precauciones para su manejo. Usar ropa, gafas protectoras y guantes.
- Los anticuerpos con fluorocromo tandem son más brillantes que los conjugados sólo pero son particularmente más sensibles a degradación foto inducida, resultando en pérdida de fluorescencia y cambios en desborde de la fluorescencia.
- Las células marcadas deberían analizarse dentro de las 4 horas de marcación previamente refrigeradas (2 – 8°C) y cubiertas de la luz

6.7. EVALUACIÓN

6.7.1. VALORES DE ALERTA Y/O CRÍTICOS, CUANDO CORRESPONDA

No aplica

6.7.2. INTERPRETACION CLÍNICA DEL LABORATORIO

Revisión, análisis y elaboración de informe final por Médico Patólogo Clínico, previa evaluación del control de calidad y calibraciones diarias; y según corresponda, la información clínica disponible e interpretación de resultados.

6.7.3. FUENTES POTENCIALES DE VARIACIÓN

a) Muestra

- Muestra no corresponde al paciente.
- Muestra mal identificada.
- Toma de muestra inadecuada (No se cumple relación anticoagulante/muestra, muestra diluida)
- Muestra con presencia de coágulos o microcoágulos.
- Uso de otros anticoagulantes diferentes al EDTA durante la toma de muestra.
- Presencia de fibrina en muestra para adquirir.

b) Deterioro de reactivos

- Cambio en la apariencia del reactivo.
- Precipitación o decoloración indican inestabilidad o deterioro.

c) Experticia del personal encargado del proceso y análisis.

d) Interferencia o falla eléctrica.

- Humedad mayor de 80% interfiere en potencia del láser rojo, este disminuye su potencia.
- El ruido electrónico afecta estabilidad del voltaje.

- Falta de mantenimiento afecta la alineación del láser y desempeño de fotomultiplicadores.

e) Cambios de metodología

- En caso de cambio de metodología, esta será informada oportunamente en el resultado del paciente

6.7.4. COMPLICACIONES

No aplica

VII. RESPONSABILIDADES

7.1. Médico Jefe del servicio de Hematología

- Aprobar el procedimiento y autorizar cualquier cambio sobre lo expresado en el presente documento.

7.2. Médico Asistente del servicio de Hematología

- Supervisar el cumplimiento de lo expresado en el presente documento.
- Comunicar al Médico Jefe cualquier actualización según los reglamentos aplicables.
- Reportar en el registro de No conformidad cualquier evento que incumpla con lo estipulado en el presente documento.
- Asegurar los recursos necesarios para el desarrollo de lo expresado en el presente Documento.

7.3. Responsable de calidad del Laboratorio

- Difundir y verificar de forma permanente el cumplimiento del presente documento.

7.4. Tecnólogo Médico

- Cumplir lo dispuesto en el documento
- Realizar el control de calidad correspondiente
- Elaborar el Procedimiento

7.5. Técnico de laboratorio

- Verificación de las condiciones pre analíticas de la muestra.
- Transporte de muestras.

VIII. ANEXOS

8.1. ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO/ SOLICITUD DE ANÁLISIS DE LABORATORIO

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
DIDAP SERVICIO DE HEMATOLOGÍA
SOLICITUD DE ANALISIS CITOMETRIA DE FLUJO

CÓDIGO INTERNO

INISN

APELLIDOS Y NOMBRES: _____ **HISTORIA CLÍNICA:** _____

EDAD: _____ **PROCEDENCIA:** _____ **TELÉFONO:** _____

FECHA NACIMIENTO: _____ **DIAGNÓSTICO:** _____

SERVICIO: _____ **CAMA:** _____

TIPO DE MUESTRA: MÚDULA ÓSEA ☐ SANGRE PERIFÉRICA ☐ LCR ☐

ANÁLISIS	
88201	Estudio linfocitos T CD4+ CD8+
88205	Estudio linfocitos T / B / NK
88204	Leucemia Aguda (Debut) SMD
88182.01	Citometría Índice de ADN
88185.01	Citometría de flujo para detección de HPN

1. DATOS DEL PACIENTE (TODOS LOS CASOS)

Tratamiento recibido:

Quimioterapia: SI ☐ NO ☐ Fecha: / / Trasplante: SI ☐ NO ☐ Fecha: / /

Transfusiones: SI ☐ NO ☐ Fecha: / /

Estudios: Citogenética: _____ Biología Molecular: _____

2. DATOS CLÍNICOS

Tiempo de enfermedad actual: _____ días ☐ meses ☐ años ☐

Caracterizado por:

☐ Anemia ☐ Adenopatías ☐ Esplenomegalia

☐ Hepatomegalia ☐ Lesiones en piel ☐ Masa Tumoral ☐ Comenismo SNC

☐ Linfadenomegalia ☐ Otros: _____

3. LABORATORIO CLÍNICO

Infección por: HIV ☐ EBV ☐ Hepatitis B ☐ Hepatitis C ☐ CMV ☐

Otros: _____

4. DATOS HEMATOLOGICOS:

Hta: _____ Unifocitos: _____ Segmentados: _____

Hb: _____ Monocitos: _____ Abastados: _____

Leucocitos: _____ Eosinófilos: _____ Basófilos: _____

Plaquetas: _____ Blastos: _____ L variante: _____

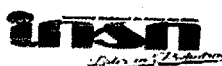
Otros hallazgos: _____

Sello y Firma: _____ **Fecha:** _____

MUESTRA TOMADA POR: _____ **FECHA Y HORA TOMA DE MUESTRA:** _____

HORA ENTREGA DE MUESTRA: _____

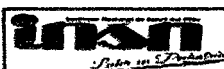
Fuente: Elaboración propia - Servicio de Hematología



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
PETITORIO DE ANÁLISIS CITOMETRÍA DE FLUJO

RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA Y ENVÍO DE SOLICITUDES

1. Las solicitudes de análisis que no presenten los datos requeridos no serán aceptadas.
2. Las muestras sin rótulo no serán recibidas.
3. Para Estudio de Linfocitos T CD4+, CD8+ y Estudio de Linfocitos T/B/NK: Sangre periférica en tubo EDTA K2 (mínimo 3mL).
4. Para Leucemia Aguda Debut/SMD: Sangre medular en tubo de EDTA K2 (mínimo 3mL).
5. Muestras de sangre periférica coagulada y/o volumen insuficiente serán rechazadas.
6. Transporte de muestras inmediato a temperatura ambiente, con medidas de bioseguridad adecuadas.
7. Enviar una lámina con el frotis de la muestra que se ha tomado o una lámina de aspirado de MO (Excepto LCR)
8. En los casos de controles indicar etapa del tratamiento en que el paciente se encuentra.
9. Descripción del fenotipo diagnóstico debut en el caso de EMR.
10. Las muestras de LCR y otros líquidos corporales TODOS deben ser tomadas en tubos EDTA K2 con estabilizante celular (Transfix), que será entregado por nuestro laboratorio previa coordinación.
11. El envío de muestras externas deberá ser coordinado con el Servicio



Fecha y Hora: ____/____/____

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA

Paciente: _____ H.C.I.: _____

Una toma de muestra de sangre periférica presenta riesgos muy limitados, sin embargo en algunos casos puede ocasionar un hematoma e inflamación en el área del pinchazo posterior a la extracción, éstos efectos no son graves y tienden a desaparecer, para reducir esta posibilidad es recomendable que posterior al procedimiento se mantenga presión en la zona del pinchazo por al menos 10 a 15 minutos y se sugiere no flexionar el brazo ni realizar esfuerzo físico. Es nuestro deber informar de esta posibilidad para que usted este informado, por lo que se requiere su consentimiento para realizar el procedimiento.

Yo _____ con DNI N° _____ (PADRE/APODERADO), A TRAVÉS DEL PRESENTE DECLARO CONOCER LOS RIESGOS ASOCIADOS AL PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRA DE SANGRE Y DOY MI CONSENTIMIENTO PARA SU REALIZACIÓN.

FIRMA DE FAMILIAR O APODERADO
NOMBRE: _____

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Fecha y Hora: ____/____/____

Se me ha informado que puedo revocar este consentimiento aún después de haberlo firmado y, por ello **NO AUTORIZO** la realización del procedimiento descrito anteriormente y, habiendo entendido las implicancias que ello conlleva, asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida de mi menor hijo, deslindando de toda responsabilidad al Equipo médico y a la Institución.

Fuente: Elaboración propia - Servicio de Hematología

8.4 ANEXO 4: PARTICIPANTES EN LA ELABORACIÓN DE LA GUÍA TÉCNICA

Elaborado por:	Lic TM Ivonne Carranza Champac				
Firma y Sello:	** MINISTERIO DE SALUD INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO <i>Ivonne Carranza</i> LIC. IVONNE PATRICIA CARRANZA CHAMPAC TECNÓLOGO MÉDICO C.T.M.P. 8142				
Fecha:	07/08/2023	Hora:	14:00	Lugar:	Lima

Revisado por:	Dra. Dina Olave Quispe				
Firma y Sello:	** MINISTERIO DE SALUD INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO <i>Dina Olave Quispe</i> Dra. Dina Marleni Olave Quispe PATOLOGO CLINICO JEFE DEL SERVICIO DE HEMATOLOGIA CMP. 53416 RNE. 28167				
Fecha:	24/08/2023	Hora:	16:00	Lugar:	Lima

	Jefe de Servicio			Jefe de Departamento	
Aprobado por:	Dra. Dina Olave Quispe				
Firma y Sello:	** MINISTERIO DE SALUD INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO <i>Dina Olave Quispe</i> Dra. Dina Marleni Olave Quispe PATOLOGO CLINICO JEFE DEL SERVICIO DE HEMATOLOGIA CMP. 53416 RNE. 28167			** MINISTERIO DE SALUD INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO <i>M.C. LILIANA PATINO GABRIEL</i> M.C. LILIANA PATINO GABRIEL Jefe (e) del Departamento de Investigación Docencia y Atención en Patología CMP N° 28863 RNE N° 14573 RNA N° A6146	
Fecha:	28/08/2023	Hora:	10:00	Lugar:	Lima

**** Colocar Firma y Sello del personal participante.**

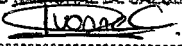
8.5. ANEXO 5: DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERESES**Declaración de conflicto de intereses**

El/los elaborador(es), el/los revisor(es) y el/los Jefe(s) declaran no tener ningún conflicto de interés potencial con respecto a la investigación, autoría y/o publicación de la Guía Técnica: *(nombre de la guía técnica)*

ELABORADO POR:

Lic TM. Ivonne Carranza Champac

Firma y Sello:

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO

LIC. IVONNE PATRICIA CARRANZA CHAMPAC
TECNÓLOGO MÉDICO
C.T.M.P. 8028

Fecha, hora y lugar: ...15 Diciembre 2023, 14:00 horas, Lima

REVISADO POR:

Dra. Dina Olave Quispe

Firma y Sello:

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO

Dra. Dina Marleni Olave Quispe
PATOLOGO CLINICO
JEFE DEL SERVICIO DE HEMATOLOGIA
CMP. 53416 RNE. 28167

Fecha, hora y lugar: ...15 Diciembre 2023, 16:00 horas, Lima

APROBADO POR:

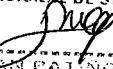
Jefe de Departamento: M. C. Lilian Patiño Gabriel

Jefe de Servicio: Dra. Dina Olave Quispe

Firmas y Sellos:

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO

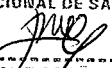
Dra. Dina Marleni Olave Quispe
PATOLOGO CLINICO
JEFE DEL SERVICIO DE HEMATOLOGIA
CMP. 53416 RNE. 28167

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO

M.C. LILIAN PATIÑO GABRIEL
Jefe (e) del Departamento de Investigación
Docencia y Atención en Patología
CMP N° 28863 RNE N° 14573 RNA N° A6146

Fecha, hora y lugar: ...15 Diciembre 2023, 10:00 horas, Lima

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO

Dra. Dina Marleni Olave Quispe
PATOLOGO CLINICO
JEFE DEL SERVICIO DE HEMATOLOGIA
CMP. 53416 RNE. 28167

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO

M.C. LILIAN PATIÑO GABRIEL
Jefe (e) del Departamento de Investigación
Docencia y Atención en Patología
CMP N° 28863 RNE N° 14573 RNA N° A6146

8.6. ANEXO 6: INSUMOS, EQUIPOS BIOMÉDICOS Y/O MEDICAMENTOS, PERSONAL Y TIEMPOS UTILIZADOS

Instrucción: detallar de manera ordenada en el cuadro de denominación el/los equipos biomédicos, instrumental y mobiliario a utilizar, además de la cantidad y especificaciones de cada uno.

N°	Denominación	Cantidad	Especificaciones
	Citómetro de flujo de 8 colores.	--	Equipo en cesión de uso
	Agitador de tubos tipo vortex.	--	Equipo en cesión de uso
	Micropipeta de 1 – 10 ul	--	Equipo en cesión de uso
	Micropipeta de 10 – 100 ul	--	Equipo en cesión de uso
	Micropipeta de 100 – 1000 ul	--	Equipo en cesión de uso
	Conservadora de reactivos	--	
	Centrifuga para tubos.	--	
	Tubo para extracción de sangre con sistema de vacío de polipropileno de 3 mL con EDTA dipotasico.	1 unidad.	
	Guantes de nitrilo para examen descartable talla M	1 par	
	Aguja descartable 20G x 1"	1 unidad	
	Lentes protectores de policarbonato.	1 unidad	
	Papel bond 80 gr tamaño A4	4 unidades	
	Punteras descartables de 1 – 10 ul.	10 unidades	Consumible en cesión de uso
	Punteras descartables de 10 – 100 ul.	5 unidades	Consumible en cesión de uso
	Punteras descartables de 100 – 1000 ul.	3 unidades	Consumible en cesión de uso
	Tubos para citometría de flujo de 12 x 75 mm.	8 unidad	Consumible en cesión de uso
	Gradilla para tubos de 12 x 75 mm.	-	Consumible en cesión de uso
	Solución tampón (buffer) para citometría de flujo	2 litros	
	Solución de limpieza para citómetro de flujo	56 ml	
	Solución shut down	83 ml	
	Solución lisante de glicol dietileno y formaldehído 10x	8 ul	
	Solución TAMPON (buffer) PBS	100 ml	Consumible en cesión de uso
	Albumina bovina	0.1 gr	Consumible en cesión de uso

	Azida sódica	0.05 gr	Consumible en cesión de uso
	Anticuerpo monoclonal CD 16/v 450	3 ul	
	Anticuerpo monoclonal CD 45 con pacif orange/v 500	5 ul	
	Aerolisina fluorescente	5 ul	
	Anticuerpo Monoclonal CD 157 Con Ficoeritrina	5 ul	
	Anticuerpo monoclonal CD 33 con peridina proteína clorofila y cianina 5.5	10 ul	
	Anticuerpo Monoclonal CD 10 Con Ficoeritrina-Cianina 7	5 ul	
	Anticuerpo Monoclonal CD 64 Con Allofococianina	5 ul	
	Anticuerpo Monoclonal CD 14 Con Allofococianina-H7	5 ul	

Instrucción: detallar de manera ordenada en el cuadro las características de los medicamentos con D.C.I. (Denominación Común Internacional), concentración, forma farmacéutica, presentación y dosis.

Nº	Dci	Concentración	Forma Farmacéutica	Presentación	Dosis
	N/A	---	---	---	---

Instrucción: detallar de manera ordenada, los tiempos aproximados y el personal que interviene en cada paso durante el procedimiento.

Nº	Paso Del Procedimiento	Personal Que Interviene	Tiempo Aproximado (Min)
	Actividad 1: Recepción de muestras en el laboratorio de Hematología.	1 Tecnólogo Médico	2 minutos
	Actividad 2: Procesamiento de la muestra.	1 Tecnólogo Médico	9.5 minutos
	Actividad 3: Adquisición en el Citómetro	1 Tecnólogo Médico	5 minutos
	Actividad 4: Análisis y elaboración de informe final	1 Médico Patólogo Clínico	30 minutos

8.7. ANEXO 7: PANEL DE ANTICUERPOS

PANEL DE ANTICUERPOS PARA HPN							
V450	V500	FITC	PE	PERCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APCH7
CD16	CD45	FLAER	CD157	CD33	CD10	CD64	CD14

FUENTE: Elaboración propia: Servicio de hematología

8.8. ANEXO 8: FORMATO DE INFORME DE RESULTADOS



DIDAP
SERVICIO DE HEMATOLOGÍA
INFORME DE CITOMETRÍA DE FLUJO

HCL: _____

MEDICO: _____

PROCESADO: _____

SERVICIO: _____

DIAGNOSTICO: _____

NOMBRE: _____

MUESTRA: _____

EDAD: _____

FECHA INFORME: _____

FECHA TM: _____

FORMATO: _____

ESTUDIO: _____

INFORMACIÓN POBLACIONAL

Neutrófilo: _____	%	Eosinófilo: _____	%
Monocitos: _____	%	Linfocitos: _____	%
Basófilo: _____	%		%
	%		%

CELULARIDAD DE LA MUESTRA: _____ %

COMENTARIO

Anticuerpos utilizados para la identificación de Neutrófilos: CD45, CD10
 Anticuerpos utilizados para la identificación de Monocitos: CD45, CD64

Identificación de clonas de HPN en Neutrófilos:
 CD16, CD157, FLAER (Proteínas GPI dependientes)

Identificación de clonas de HPN en Monocitos:
 CD14, CD157, FLAER (Proteínas GPI dependientes)

En x eventos totales válidos para análisis, los neutrófilos y monocitos evaluados presentan expresión normal de proteínas GPI (Glucosil Fosfatidil Inositol) dependientes.
 No se identifica presencia de clonas de HPN (Hemoglobinuria Paroxística Nocturna) en neutrófilos ni en monocitos.

CONCLUSIÓN

LOS NEUTRÓFILOS Y MONOCITOS PRESENTAN EXPRESIÓN NORMAL DE PROTEÍNAS GPI DEPENDIENTES. NO FUE DETECTADO CLON DE HPN POR FENOTIPO DE MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA.

FUENTE: Elaboración propia - Servicio de Hematología

8.9. ANEXO 9: FORMATO DE HOJA DE TRABAJO

		REPORTE PROCESAMIENTO MUESTRAS: LEUCEMIA			
				VERSIÓN 01	

CONMO MUESTRA:		HISTORIA CLÍNICA:	FORMATO LABOR:	
APELLIDOS Y NOMBRES PACIENTE:		TPO DE MUESTRA:		
EDAD:	SERVICIO:	RESPONSABLE PROCESAMIENTO:		
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN:		FECHA DE PROCESO:		

Verificación de muestra:

1. Colóide nombre en orden con rotulo en tubo	SI	NO
2. El tubo se encuentra cerrado herméticamente	SI	NO
3. La muestra se encuentra en tubo adecuado para prueba (EDTA)	SI	NO
4. La muestra presenta coágulos por las paredes externas.	SI	NO
5. La muestra se encuentra a temperatura adecuada.	SI	NO
6. La muestra presenta coágulos.	SI	NO
7. El volumen de muestra es adecuado	SI	NO

Procesamiento de la muestra:

CELULARIDAD MUESTRA (POR uL):		Para adquirir (eventos):		Se adquirió:				
				<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">ALOT:</td> <td style="width: 50%;"></td> </tr> <tr> <td>Panel comp:</td> <td></td> </tr> </table>	ALOT:		Panel comp:	
ALOT:								
Panel comp:								

CANTIDAD DE MUESTRA A DISPENSAR:		ALOT:
		Panel complementario:

PANEL PROCESADO:	☐ ALOT	☐ LST	☐ MRO T1	☐ INDICE ADN
	☐ S-ALL	☐ T-ALL	☐ SMD	☐ HPN

COMENTARIOS:

PANEL ALOT:

PANEL COMPLEMENTARIO:

Al término de la adquisición, verificar

1. Se marcó correctamente la muestra 2. Hubo problemas en la adquisición	SI	NO
	SI	NO

LECTURA DE LAMINA

Nota de lectura:	Responsable de lectura:
Blastos: _____ Promielocitos: _____ Mielocitos: _____ Metamielocitos: _____ Abastados: _____ Segmentados: _____ Linfocitos: _____ Monocitos: _____ Eosinofilos: _____ Basofilos: _____ Otros: _____	

FUENTE: Elaboración propia - Servicio de Hematología

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO

Dra. Dina Marleni Olave Quispe
PATOLOGO CLINICO
JEFE DEL SERVICIO DE HEMATOLOGIA
CMP. 53446 RNE. 28167

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO

M.C. LILIANA PATRICIA GABRIEL
Jefe (c) del Departamento de Investigación
Docencia y Vinculación en Patología
CMP N° 28863 RNE N° 14573 RNA N° A6146

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Borowitz MJ et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* [Internet] 2010 [consultado 1 agosto 2023];78(4): 211-230. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.20525>
2. Pérez-Lara J, Santiago W, Roemro H, Rodriguez J. Fundamentos de Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. [Internet] 2018 [consultado 6 agosto 2023]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2018/muv182d.pdf>
3. Villegas A. Urbano A. Guía Clínica HPN: Consenso español para diagnóstico y tratamiento de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. SEHH [Internet]. 2014 [citado 6 agosto 2023]. Disponible en: https://www.hpne.org/portal1/images/content/Guias_HPNE_2014.pdf
4. Brodsky R. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* [Internet] 2009 [consultado 1 agosto 2023]; 113: 6522-27. Disponible en: <https://ashpublications.org/blood/article/113/26/6522/26212/How-I-treat-paroxysmal-nocturnal-hemoglobinuria>
5. Perez I, Garcia T, Fundora T, Fernandez N. Hemoglobinuria paroxística nocturna: de Strubing al Eculizumab. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* [Internet]. 2013 [citado 6 agosto 2023]; 29(3). Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/66>