


| | | |
|--|---|--|
|  | INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LEUCOCITOS RESIDUALES POR CITOMETRÍA DE FLUJO | Código: IT-IS-BS-10 |
| | DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO | Fecha de Revisión: Septiembre 2019 Versión vigente: 01 |

| INDICE | Pág. |
|--------------------------------|-------------|
| 1.0 ALCANCE..... | 01 |
| 2.0 DOCUMENTOS APLICABLES..... | 01 |
| 3.0 DEFINICIONES..... | 01 |
| 4.0 MATERIAL Y EQUIPO | 02 |
| 5.0 DESARROLLO..... | 03 |
| 6.0 ANEXOS..... | 06 |
| 7.0 CONTROL DE CAMBIOS..... | 06 |

1. Alcance:

Esta Instrucción de trabajo aplica para el proceso de cuantificación de células residuales, específicamente leucocitos por el método de citometría de flujo en los hemocomponentes obtenidos en el banco de sangre del Hospital civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde de acuerdo a los criterios de la Norma Oficial Mexicana.

2. Documentos Aplicables:

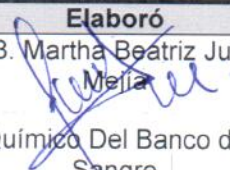
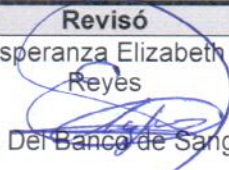
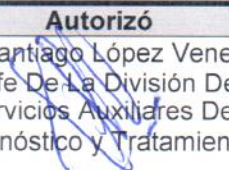
FT-IS-BS-74 Reporte para el procesamiento de leucocitos residuales
 FT-IS-BS-09 Control de Calidad Interno Mensual en Concentrado Eritrocitario
 FT-IS-BS-10 Control de Calidad Interno Mensual en Plasma Fresco Congelado
 FT-IS-BS-11 Control de Calidad Interno Mensual en Concentrado Plaquetario
 FT-IS-BS-58 Control de calidad Interno en concentrado plaquetario obtenido por Aféresis automatizada
 N/A Libreta de resultados Leucocitos residuales
 N/A Manual del Equipo citómetro de Flujo

3. Definiciones:

Ácido desoxirribonucleico: molécula que contiene la información genética de un individuo que se transfiere de generación en generación y que codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células.

Antígeno: sustancia capaz de estimular una respuesta inmune con la formación de anticuerpos.

Calidad: grado en el que un conjunto de características inherentes cumple con los requisitos preestablecidos.

| | Elaboró | Revisó | Autorizó |
|---------------------|--|---|---|
| COPIA NO CONTROLADA | QFB. Martha Beatriz Juárez Mejía  Químico Del Banco de Sangre | Dra. Esperanza Elizabeth Zuno Reyes  Jefe Del Banco de Sangre | Dr. Santiago López Venegas  Jefe De La División De Servicios Auxiliares De Diagnóstico y Tratamiento |



INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LEUCOCITOS RESIDUALES POR CITOMETRIA DE FLUJO

Código: IT-IS-BS-10

Página 2 de 6

Fecha de Revisión:
Septiembre 2019

Versión Vigente: 01

DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE
DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

Capa leucocitaria: fracción sanguínea que contiene principalmente leucocitos, separada por centrifugación de una unidad de sangre total.

Capa leucoplaquetaria: fracción sanguínea que contiene principalmente leucocitos y plaquetas, separada por centrifugación de una unidad de sangre total.

Concentrado de eritrocitos en solución aditiva (CE): unidad que contiene mayoritariamente glóbulos rojos, obtenidos por fraccionamiento de una unidad de sangre total de una donación única o de una sesión de aféresis a la que se añade una solución nutritiva o conservadora.

Concentrado de eritrocitos Leucodepletado (CEL): unidad de glóbulos rojos sometida a eliminación de leucocitos hasta una cifra igual o menor de un millón por unidad, desde su extracción mediante aféresis o mediante técnicas de filtrado.

Concentrado de plaquetas (CP): unidad que contiene principalmente trombocitos suspendidos en plasma, obtenidos por aféresis o preparados mediante fraccionamiento de unidades de sangre fresca de una donación única.

Concentrado de plaquetas obtenidas por aféresis (AFÉRESIS): unidad que contiene trombocitos en suspensión obtenida por métodos de aféresis.

Control de calidad: son las actividades y técnicas operativas desarrolladas para cumplir con los requisitos de calidad establecidos.

Leucocitos: Conjunto heterogéneo de células sanguíneas que son los efectores celulares de la respuesta inmunitaria, interviniendo así en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos (antígenos). Se originan en la médula ósea y en el tejido linfático.


Microlitro: Unidad de volumen equivalente a la millonésima parte de un litro, representada por el símbolo μl . (También equivale a 1 milímetro cúbico $1 \mu\text{L} = 10^{-6} \text{L} = 1 \text{mm}^3$)

Plasma fresco: aquel obtenido de un donante de sangre total o mediante aféresis, en estado líquido, mantenido durante un periodo de tiempo y a una temperatura determinada que permitan que los factores lábiles de la coagulación permanezcan funcionales.

Productos sanguíneos: término genérico empleado para designar los diversos preparados de la sangre que tienen utilidad terapéutica, incluyen las unidades de sangre total, de sus componentes y mezclas de éstos.

4.0 Material y Equipo:

- * Citómetro de flujo
- * Células de referencia
- * Agua destilada
- * Tubos de plástico (12 x 75mm)

| | | |
|--|---|---------------------------------------|
|  | INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LEUCOCITOS RESIDUALES POR CITOMETRIA DE FLUJO | Código: IT-IS-BS-10 |
| | | Página 3 de 6 |
| | DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO] | Fecha de Revisión: Septiembre 2019 |
| Versión Vigente: 01 | | |

- * Pipetas calibradas (20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L)
- * Puntillas (20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L)
- * Mezclador vortex
- * Kit de controles para plaquetas
- * Kit de controles para glóbulos rojos
- * Reactivo para determinar leucocitos residuales:
- * Reactivo de lisis
- * Reactivo de yoduro de propidio (teñir)
- * Fluoresferas
- * Solución amortiguadora (buffer)
- * Solución de limpieza(cleanze)
- *

5. Desarrollo:

| No. | Responsables | Descripción de la Actividad |
|--|--------------|--|
| 5.1 | Químico /TLC | Recibe las muestras de componentes sanguíneos en viales de polipropileno con volumen de 500 μ L, del área de control de calidad, para la determinación de leucocitos residuales; registrados en FT-IS-BS-74 Reporte para el procesamiento de leucocitos residuales |
| Análisis por Citometría de Flujo: | | |
| 5.2 | Químico /TLC | Verifica antes de encender el equipo que las soluciones de buffer, de dilución y solución de lavado estén en su nivel óptimo de carga. Enciende primeramente el CPU de la computadora, enseguida el monitor. Entra a la pantalla de inicio con la tecla enter. Ya en el software busca la opción de encendido del citómetro de flujo presiona doble enter, y automáticamente enciende el equipo. Selecciona carpeta Banco de Sangre e introduce contraseña enseguida presiona sobre finish y permite la entrada a búsqueda de protocolos. Espera aproximadamente 40 minutos para la inicialización del equipo (ver N/A Manual del Equipo Citometro de Flujo) |
| 5.3 | Químico /TLC | Atempera los reactivos a utilizar aproximadamente 30 minutos. Rotula los tubos según el orden a seguir. |



INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LEUCOCITOS RESIDUALES POR CITOMETRIA DE FLUJO



Código: IT-IS-BS-10


Página 4 de 6

Fecha de Revisión:
Septiembre 2019


Versión Vigente: 01

DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO]

| | | |
|----------------------------------|---------------------|--|
| 5.4 | Químico /TLC | Selecciona protocolo para el proceso del control de calidad diario el cual permite la alineación de los gráficos: Coloca en la posición del carrusel el tubo con 20 gotas del reactivo flow check, número de carrusel y localización, presiona icono Play  . (MANAGER-RESOURCE EXPLORER- CARPETA COMMON protocolo flow-set PRO una vez aprobado el protocolo procesa flowcheck QC4C1LFITC-PE-ECD-PC5-flowCheckALING) |
| Preparación de la muestra | | |
| 5.5 | Químico /TLC | Verifica que las muestras, que recibió del área de control de calidad, cumplan con el tiempo aceptable, para su proceso. Ya que este no excederá de más de 48 horas después del fraccionamiento de las unidades. Verifica la temperatura de los hemocomponentes a analizar: para Concentrado de Plaquetas y Aféresis será de (20-25 °C). Para Concentrado de Eritrocitos y Plasma fresco será de (2-8° C). |
| 5.6 | Químico /TLC | Agrega 100 µL de muestra a cada tubo rotulado, dispensándola cuidadosamente hasta el fondo y sin tocar la pared. |
| 5.7 | Químico /TLC | Agrega 100 µL del reactivo de lisis, inmediatamente pasa por el vortex de 5-10 segundos. Agrega 500 µL del reactivo de tinción a cada tubo, inmediatamente pasa por el vortex de 5-10 segundos. Se resguarda a temperatura ambiente (20-25°C) durante 15 minutos y protegido de la luz. Agrega 100 µL del reactivo de Fluoroesferas a cada tubo de muestra, dispensándola cuidadosamente hasta el fondo y sin tocar la pared. Pasa por vortex de 5-10 segundos (muestra lista para analizar) |
| 5.8 | Químico /TLC | Selecciona y arrastra con el mouse el protocolo hacia la parte inferior del monitor para formar la lista de trabajo según el inserto y recomendaciones del fabricante; ya que según el número de muestras a procesar; es el número de veces que se toma el protocolo. Coloca en la posición 1 del carrusel el primer tubo de muestra y así consecutivamente, ingresa los datos del número de carrusel y localización de las muestras y presiona Play  para comenzar la cuantificación celular. |

| | | |
|--|---|---------------------------------------|
|  | INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LEUCOCITOS RESIDUALES POR CITOMETRIA DE FLUJO | Código: IT-IS-BS-10 |
| | | Página 5 de 6 |
| | DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO] | Fecha de Revisión: Septiembre 2019 |
| | | Versión Vigente: 01 |

| | | |
|------|------------------------------------|--|
| 5.9 | Químico /TLC | <p>Imprime y reporta resultados en la bitácora N/A Libreta de resultados Leucocitos residuales y en FT-IS-BS-74 Reporte para el procesamiento de leucocitos residuales</p> <p> $\text{Cuento absoluto} = \frac{\text{Total de Células contadas}}{\text{Factor de Calibración}} \times \text{Factor de calibración} \times 10 = (\text{Células}/10\mu\text{L}) \times 10$ </p> <p> $\frac{\text{Células}}{10 \mu\text{L}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ ml}} \times \text{Volumen de la unidad} = \text{Células por Unidad de CE, CP, AFERESIS}$ </p> <p>*PLASMA FRESCO:</p> <p> $\text{Cuento absoluto} = \frac{\text{Total de Células contadas}}{\text{Factor de Calibración}} \times \text{Factor de calibración} \times 10 = (\text{Células}/10\mu\text{L}) \times 10$ </p> <p> $\frac{\text{Células}}{10 \mu\text{L}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ Lt}} \times \text{Volumen de la unidad en ml} = \text{Células por Litro (L)}$ </p> |
| 5.10 | Químico /TLC | Realiza protocolo de limpieza (ver N/A Manual del equipo citómetro de Flujo) y apaga el equipo |
| 5.11 | Químico /TLC | <p>Entrega resultados impresos y el FT-IS-BS-74 Reporte para el procesamiento de leucocitos residuales al área de control de calidad , para que el Químico encargado de dicha área revise los resultados de acuerdo al anexo I y registre en: FT-IS-BS-09 Control de Calidad Interno Mensual en Concentrado eritrocitario FT-IS-BS-10 Control de Calidad Interno Mensual en Plasma fresco congelado FT-IS-BS-11 Control de Calidad Interno Mensual en Concentrado plaquetario FT-IS-BS-58 Control de calidad Interno en concentrado plaquetario obtenido por Aféresis automatizada</p> <p>*Nota: los resultados procesados de otra institución se entregan al personal administrativo para sean entregados en impreso con fecha y firma de recibido</p> |
| 5.12 | Administrativo del Banco de Sangre | Archiva los resultados de leucocitos residuales, procesados para otra institución |

| | | |
|--|---|------------------------------------|
|  | INSTRUCCIÓN DE TRABAJO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LEUCOCITOS RESIDUALES POR CITOMETRIA DE FLUJO | Código: IT-IS-BS-10 |
| | | Página 6 de 6 |
| DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIGNÓSTICO Y TRATAMIENTO] | | Fecha de Revisión: Septiembre 2019 |
| | | Versión Vigente: 01 |

6. Anexos:

I. Tabla 1. Valores de referencia para la medición de leucocitos residuales en hemocomponentes sanguíneos.

| Parámetro | Componente sanguíneo | Especificación, |
|---|---|---|
| Leucocitos | Concentrado de eritrocitos sin capa leucoplaquetaria | <1.2 x 10 ⁹ por unidad (en el 90% de las unidades probadas) |
| Leucocitos | Concentrado de eritrocitos leucodepletados en solución aditiva | <1.0 x 10 ⁶ por unidad (en el 90% de las unidades probadas) |
| Leucocitos residuales en unidades recuperadas de plasma rico en plaquetas | Plaquetas recuperadas del plasma rico en plaquetas | <0.2 x 10 ⁹ por unidad |
| Leucocitos residuales en unidades leucorreducidas | plaquetas obtenidas por aféresis | <1 x 10 ⁶ por unidad (en el 90% de las unidades) |
| Conteo de células residuales previo al congelamiento "Leucocitos" | Plasma Fresco | <0.1 x 10 ⁹ /L |

7. Control de Cambios:

| Versión Vigente | Fecha | Motivo |
|-----------------|-----------------|--|
| 0 | Marzo 2016 | Alta de Instrucción de Trabajo, anteriormente como método de trabajo |
| 01 | Septiembre 2019 | Revisión y actualización anual |