

**DIAGNOSTICO Y SEGUIMIENTO DEL PACIENTE HEMATOLOGICO:
LABORATORIO Y PATOLOGIA**

CONDICIONES DE LAS MUESTRAS PARA ANATOMIA PATOLOGICA Y CITOMETRIA DE FLUJO

DRA JUDITH VIDAL AYLLON

ANATOMIA PATOLOGICA Y LABORATORIO CLINICO

SERVICIO DE CITOMETRIA DE FLUJO



MUESTRAS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO

- Sangre periférica,
- aspirados de medula ósea,
- productos de leucaferesis,
- líquidos corporales (líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y líquido ascítico)
- . biopsias de medula ósea,
- ganglio linfático,
- bazo y timo,

Las muestras provenientes de sangre periférica aspirado de medula ósea, líquido corporal o punción de tejido sólido, deben obtenerse en tubos que contengan anticoagulante EDTA.

Especímenes de biopsia o procedimientos quirúrgicos no deben someterse a procesos de fijación o congelación sino sumergirse directamente en un frasco que contenga solución salina estéril

MUESTRAS PARA CITOMETRIA DE FLUJO

- CONSERVACION:

La **calidad de los resultados es inversamente proporcional al tiempo transcurrido desde la obtención del espécimen y al grado de manipulación** por lo tanto se recomienda siempre el empleo de muestras frescas . Es necesario iniciar la inmunotipificación lo antes posible en muestras como el liquido cefalorraquídeo y las biopsias de tejidos sólidos de pacientes con linfomas de alto grado.

- TRANSPORTE:

Colocar la muestra en nevera de icopor a **temperatura ambiente SIN CONGELAR** deben estar envueltos en gasa o algodón y a su vez estar contenidos en otro recipiente para protegerse de derrames o contaminaciones. Adicionalmente se debe enviar una lámina sin colorear de la muestra realizada al momento de la toma.

PERÍODO DE CONSERVACIÓN

La calidad de los resultados es inversamente proporcional al tiempo **trascurrido desde su obtención, siendo siempre recomendable procesarlas recién obtenidas. No es conveniente hacerlo después de 24-48h.** y en algunas muestras el tiempo recomendado es aún menor:

Líquido céfalo raquídeo, PAAF ó biopsias especialmente si contienen células susceptibles de entrar en apoptosis (algunos linfomas de célula grande, Burkitt)

TEMPERATURA

Pueden mantenerse a T^a ambiente **18-25°**

Si no puede procesarse en el tiempo adecuado y se requiere tiempos de almacenamiento ó transporte más prolongados mantener en **nevera a 4°**

TIPOS DE MUESTRA Y OBTENCIÓN

La **cantidad de muestra necesaria variará según el nº de células presentes** y el estudio que sea necesario realizar. Como norma general:

SP: En K3EDTA, 5 ml.

MO: En K3EDTA, 2-3 ml. Más cantidad obtenida en una sola punción diluyen las células de interés que puedan existir, en sangre sinusal.

Líquido pleural y ascítico: En K3EDTA, 10-20 ml

LCR: En K3EDTA, 2-3 ml. TRANSFIX

PAAF: En K3EDTA. Como diluyente, tampón fosfato PBS ph 7.4 (phospated buffered saline) ó SSF(suero salino fisiológico) estéril a ser posible

BIOPSIAS: Ganglio ó tejido no ganglionar. En fresco sin fijación ni congelación previa. Sumergida en PBS ó SSF. Si la muestra fuese mayor de un cm., trocearla con bisturí para que las células se mantengan hidratadas.

Es conveniente acompañar la biopsia de una impronta de la muestra (teñida ó no).

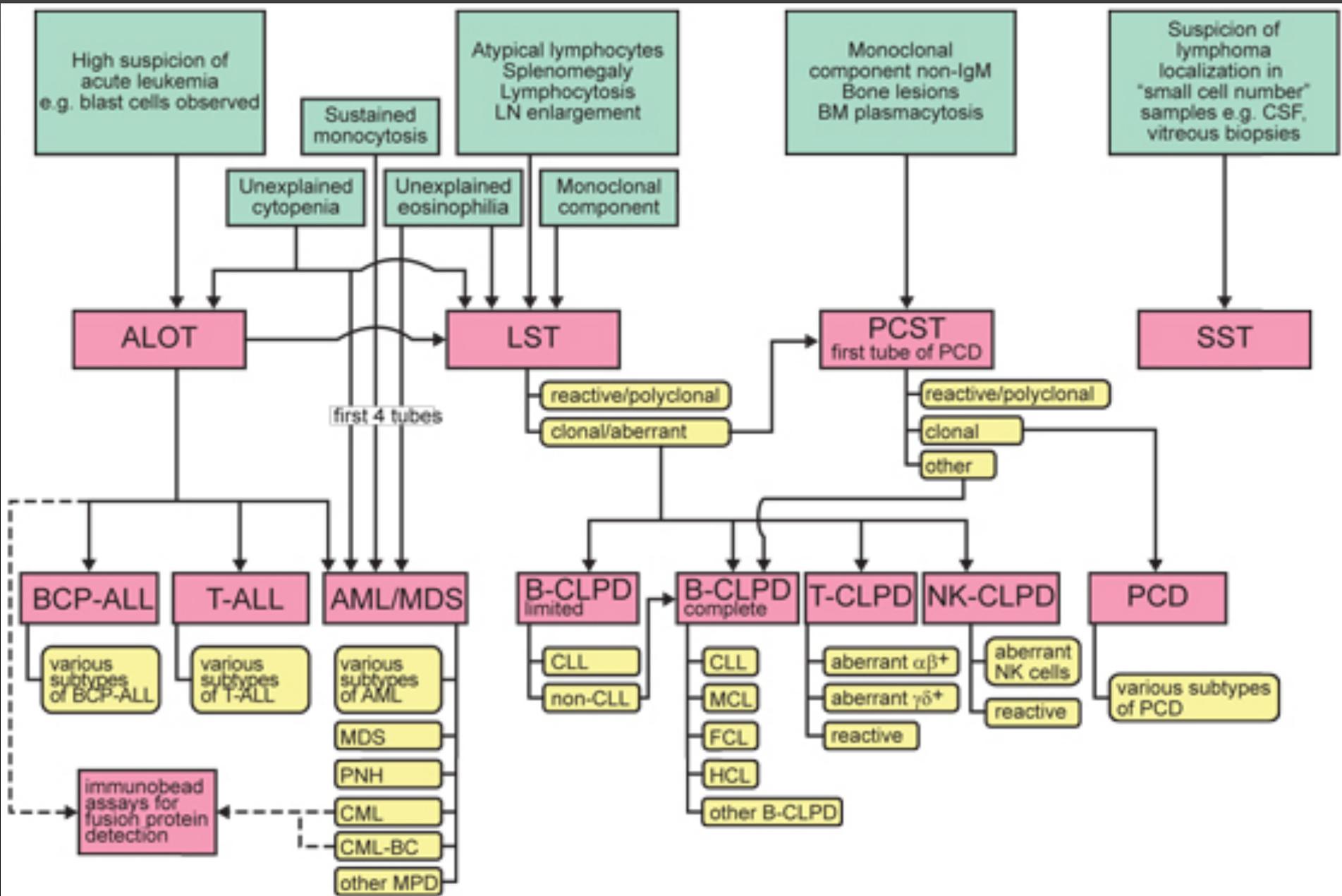
Si la biopsia va a llegar inmediatamente desde su obtención puede venir sin sumergir.

En el caso que la temperatura a la que puede estar expuesta la muestra sea mayor a 25°C, colocar un refrigerante separado con algodón de la muestra

CITOMETRÍA DE FLUJO

- Análisis de subpoblaciones linfocitarias
 - Recuento de Stem cell
 - Inmunofenotipificación.
 - Sangre,
 - MO,
 - Líquidos biológicos (LCR, de cavidades serosas) ,
 - ganglios
 - PAAF (ganglio, tiroides, nódulos subcutáneos)
-

CD34 EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL		3,5ml (mínimo 1ml)	Temperatura Ambiente (No refrigerar). Conservación 24 horas.	3 días
DETERMINACIÓN DE CD34	Sangre total EDTA (tubo tapa morada)	3,5ml (mínimo 1ml)	Temperatura Ambiente (No refrigerar). Conservación 24 horas.	3 días
Hemoglobinuria Paroxística Nocturna	Sangre total EDTA (tubo tapa morada)	3,5ml (mínimo 1ml)	Temperatura Ambiente (No refrigerar). Conservación 24 horas.	4 días
INMUNOFENOTIPO DE GANGLIO	Ganglio linfático conservado en gasa humedecida con solución fisiológica (PBS solución salina) No Conservar en Formol.	1 fragmento de tejido	Refrigerada, No Congelar. Conservación 12 horas.	3 días
INMUNOFENOTIPO DE MEDULA OSEA	Aspirado de Médula Ósea en EDTA (tubo tapa morada) o cilindro de M.O. conservado en solución fisiológica (PBS ó solución salina) No conservar en Formol.	3ml (mínimo 1ml)	Temperatura Ambiente (No refrigerar el aspirado de M.O., el cilindro se puede conservar refrigerado, No Congelar). Conservación 24 horas.	3 días
INMUNOFENOTIPO DE TESTÍCULO	Tejido	1 Fragmento de Tejido	Refrigerada, No congelar. Conservación 12 horas.	3 días
INMUNOFENOTIPO EN LIQUIDOS	Líquido cefalorraquídeo, líquido ascítico, líquido pleural, etc.	3ml (mínimo 1ml)	Temperatura Ambiente Conservación 12 horas.	3 días
INMUNOFENOTIPO EN SANGRE PERIFERICA	Sangre total EDTA (tubo tapa morada)	3,5ml (mínimo 1ml)	Temperatura Ambiente (No refrigerar). Conservación 24 horas.	3 días
LINFOCITOS T CD3+ / HLA-DR+	Sangre total EDTA (tubo tapa morada)	3,5ml (mínimo 1ml)	Temperatura Ambiente (No refrigerar). Conservación 24 horas.	48 horas
Subpoblaciones de Linfocitos B, T, NK, NKT	Sangre total EDTA (tubo tapa morada)	3,5ml	Temperatura Ambiente (No refrigerar). Conservación 24 horas	24 horas



Reporte del Primer Consenso Colombiano de Citometría de Flujo para el estudio de trastornos hematológicos

Carlos Saavedra¹, Sandra Milena Quijano², Martha Romero¹, Roberto Jaramillo³, Rocío Orduz⁴,
Carolina Echeverri⁵, Mónica Londoño⁶, Alberto Orfao⁷

¹ Departamento de Patología y Laboratorios, Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

³ Fundación Valle de Lili, Cali, Colombia

⁴ Clínica Colsanitas, S. A., Bogotá, D.C., Colombia

⁵ Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

⁶ Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia

⁷ Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Universidad de Salamanca, Salamanca, España

Tabla 1. Indicaciones médicas para la determinación de inmunofenotipo mediante citometría de flujo.

Utilidad	LLA	LMA	SLPC	SMD	SMP	GM
Diagnóstico	Sí	Sí	Sí	Sí ^a	No ^b	Sí
Clasificación	Sí	Sí	Sí	Sí*	No ^c	No
Pronóstico y extensión	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí
Seguimiento	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

LLA: leucemia linfoblástica aguda; LMA: leucemia mieloide aguda; SLPC: síndrome linfoproliferativo crónico; SMD: síndrome mielodisplásico; SMP: síndrome mieloproliferativo; GM: gammapatía monoclonal

*Información adicional por otras técnicas (morfología y citogenética)

^a El inmunofenotipo puede ser utilizado para el diagnóstico diferencial entre leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos.

^b Excepto en mastocitosis

^c Para BCR-ABL en LMC

Tabla 2. Manejo de muestras para estudios inmunofenotípicos mediante citometría multiparamétrica.

Tipo de muestra	Tiempo**	Lavados	Estabilizantes	Centrifugación	Anticoagulantes	SS/PBS transporte*
Sangre periférica** *	Hasta 24 horas	Sí	No	Sí	EDTA, heparina	No
Médula ósea	Hasta 24 horas	Sí	No	Sí	EDTA, heparina	No
Sangre de cordón umbilical	Hasta 24 horas	No	No	No	EDTA, heparina	No
Productos de leucoféresis	Hasta 24 horas	No	No	No	EDTA, heparina	No
Biopsias de tejidos sólidos***	60 minutos	Sí	No	Sí	No	Sí
Punciones de tejidos sólidos (PAAF)***	60 minutos	Sí	No	Sí	No	Sí
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	30 minutos (sin estabilizar)	Sí	Sí****	Sí (máximo dos pasos)	EDTA	No
Otros fluidos corporales***	60 minutos	Sí	Sí	Sí	EDTA	Sí

* SS (solución salina) o PBS (phosphate buffered saline) para transporte.

** Tiempo máximo comprendido entre la obtención, transporte y procesamiento de la muestra. En el caso de muestras de líquido cefalorraquídeo, si no es posible procesarlas en un tiempo inferior a 30 minutos, se recomienda el uso de estabilizantes.

*** Las muestras pueden ser estabilizadas si se requiere confirmar estudios posteriores que no pueden ser practicados durante el tiempo máximo de procesamiento.

**** Estudios recientes (22,39) demuestran que el empleo de una solución estabilizante previene la pérdida celular debida a los efectos citotóxicos in vitro del líquido cefalorraquídeo sobre los leucocitos, manteniéndose la eficacia de la estabilización por periodos superiores a las 24-48 horas de su obtención.

MUESTRAS PARA CITOMETRIA DE FLUJO

- **IDENTIFICACION:** con un rotulo que indique el tipo de muestra, datos del paciente, acompañado de un formato de solicitud de datos como:
 - Institución que remítela muestra con teléfono de contacto
 - Medico que envía la orden de examen y tipo de estudio que solicita.
 - **Fecha y hora de extracción de la muestra**
 - Tipo de muestra
 - Datos de identificación del paciente: nombre, edad etc.
 - Impresión diagnostica
 - **Datos clínicos**, información acerca de si el paciente ha recibido o no quimioterapia y en qué fase se encuentra
-

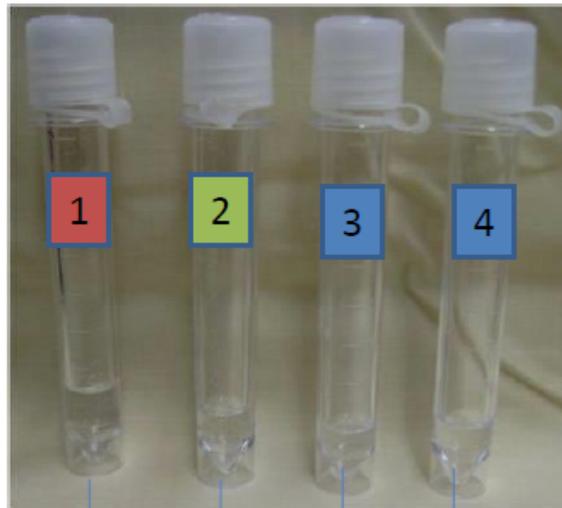
DATOS DEL SOLICITANTE		
Nombre:		Fecha solicitud: / /
Tel: ()	Fax: ()	e-mail:
Institución/Empresa:		C.I.F:
DATOS DEL PACIENTE		
Apellido:		Sexo: F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>
Nombre:		Edad:
DATOS RELATIVOS A LA MUESTRA		
Código/ referencia muestra:		Fecha toma de muestra: / /
Origen de la muestra <input type="checkbox"/> SP <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> Otro		
(especificar) _____		
DATOS CLINICOS		
Diagnóstico de sospecha	<input type="checkbox"/> Leucemia aguda <input type="checkbox"/> Mieloblástica <input type="checkbox"/> M0 <input type="checkbox"/> M1 <input type="checkbox"/> M2 <input type="checkbox"/> M3 <input type="checkbox"/> M4 <input type="checkbox"/> M5 <input type="checkbox"/> M6 <input type="checkbox"/> M7 <input type="checkbox"/> Linfoblásticas <input type="checkbox"/> Crisis blastica <input type="checkbox"/> Leucemia crónica <input type="checkbox"/> LLC <input type="checkbox"/> Otros SLP leucémicos <input type="checkbox"/> LMC <input type="checkbox"/> SMP no LMC (especificar) <input type="checkbox"/> Linfoma no Hodgkin (especificar histología) <input type="checkbox"/> Mieloma múltiple <input type="checkbox"/> Otro (especificar)	Observaciones
Fecha diagnostico _/_/_/____ -		
Momento del estudio	<input type="checkbox"/> Diagnóstico <input type="checkbox"/> EMR <input type="checkbox"/> Recaída <input type="checkbox"/> Progresión <input type="checkbox"/> Otro (especificar)	
Datos del laboratorio	Hemograma	Hb:..... g/dl Leucocitos:.....x 10 ⁹ /l Blastos/células tumorales:.....% Segmentados:.....% Linfocitos:.....% Monocitos:.....% Eosinófilos:.....% Plaquetas:.....x 10 ⁹ /L
	Bioquímica	Proteína C Reactiva:Componente monoclonal (tipo y cantidad):.....
	Médula ósea	Blastos/celulas tumorales:.....%
	Otros datos clínicos	Hepatomegalia:.....cm Esplenomegalia:.....cm Adenopatías:..... Hipertrofia gingival:..... Masa Bulky (>10cm):..... Diatesis hemorrágica:..... Infiltración extramedular/extraganglionar (especificar):.....
Protocolo terapéutico	Por favor, especifique el protocolo terapéutico que va a recibir el paciente:	

Evangelina Agriello

CFM es más sensible que CC en detección de infiltración en LCR, especialmente cuando IME está presente en recuento bajo

Quijano et al, J Clin Oncol, 2009.

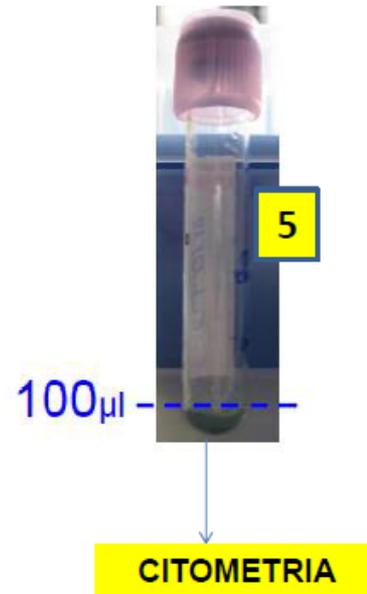
ORDEN DE TOMA DE MUESTRA



Bioq

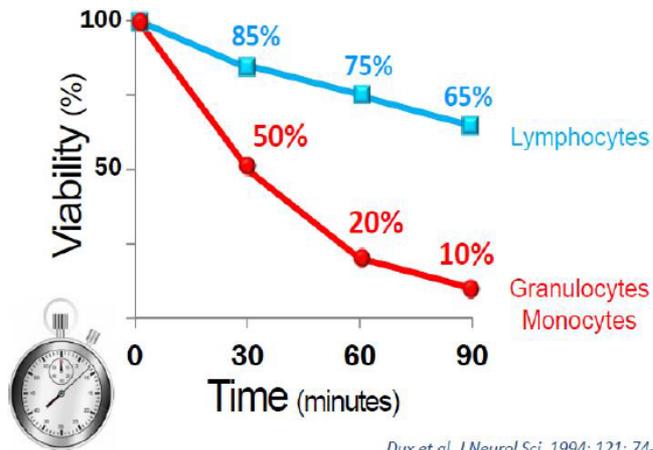
Micro

Hemato



CITOMETRIA

DISMINUCION DE LA VIABILIDAD EN MUESTRAS DE LCR



Dux et al, J Neurol Sci, 1994; 121; 74-78

SOLUCION: REACTIVO ESTABILIZANTE

- Compatible con citometría de flujo, FISH y PCR
- Estable a temperatura ambiente
- Almacenamiento: Alicuotas



26° to 37°

4



Up to 25°

7



4°

10

TransFix®

- Solución verde translúcida
- dilución 1/20
- 3ml EDTA tube



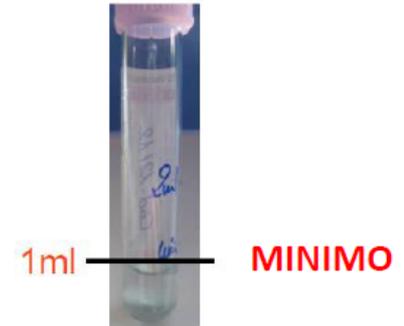
100µl



CONDICIONES DE LA MUESTRA

VOLUMEN
DE
MUESTRA:

>0= **1ml**



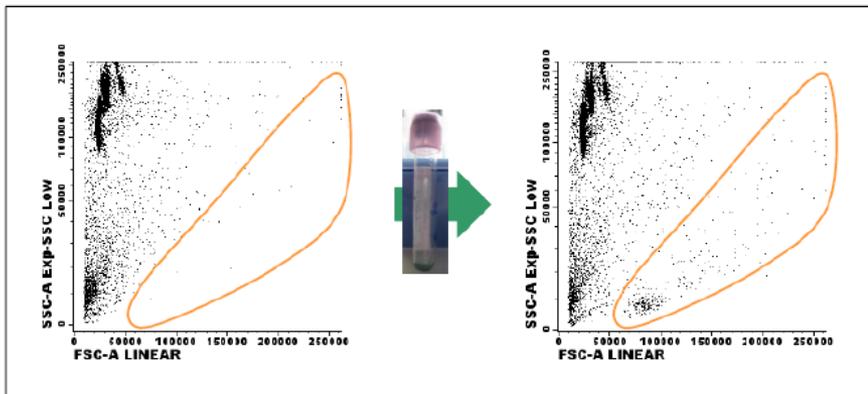
AGREGAR ANTES DE TOMA DE MUESTRA O...

AGREGAR INMEDIATAMENTE!!!

FACTORES A CONSIDERAR:

DETECCIÓN DE Ags INTRACELULARES SOLO ES
POSIBLE EN CORTO PLAZO DE FIJACIÓN

FUNCION DE REACTIVO ESTABILIZANTE EN ANTIGENOS CELULARES



SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

- Plataforma Doble
- • Gate en Linfocitos o CD45 vs. SSC
- • Siempre debe realizarse el Hemograma para poder informar los valores absolutos
- • Controles para ambos equipos
- • N° de Tubos depende del protocolo utilizado
- • Mas Económico
- • Mayor reproducibilidad

CONCLUSIONES DE LA REUNIÓN DE CITOMETRISTAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA

MARTA MORADO (H.U. LA PAZ), JOSÉ M. BOSCH (H. INSULAR LAS PALMAS), M^a ÁNGELES CUADRADO (H. U. MARQUÉS DE VALDECILLA), ANGELINA LEMES (H.U. GRAN CANARIA), AMPARO SEMPERE (H.U. LA FE), DOLORES SUBIRÁ (FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ), M^a BELÉN VIDRIALES (H.U. SALAMANCA) Y MONTSERRAT LÓPEZ RUBIO. MADRID, 27 ENERO 2009

en muestra de sangre periférica a fin de evitar interpretaciones erróneas por presencia de formas mieloides inmaduras, con expresión variable de moléculas asociadas a GPI debido al inmadurez confirmar ausencia de formas inmaduras en sangre (en casos asociados a mielodisplasia), mediante citología convencional o valorando la madurez inmunofenotípica granulocítica (CD13/CD11b, etc.).

Médula ósea evitarse por presencia de formas mieloides en varios estadios madurativos . solicitar una muestra de sangre para confirmar o no el diagnóstico de HPN.

El estudio de HPN debe hacerse en muestras anticoaguladas con EDTA (no con heparina)

Se recomienda realizar el estudio de granulocitos en las primeras 24h para evitar marcajes inespecíficos. Los hematíes pueden estudiarse hasta dos semanas después de su extracción, si se mantienen a 4°C 3,5.

HPN INFORMACION DEL PACIENTE

NOMBRE DNI: TELEFONO CELULAR EPS DIRECCION CIUDAD FECHA DE NACIMIENTO EDAD SEXO:
M F

INFORMACION DEL MEDICO REMITENTE

NOMBRE INSTITUCION TELEFONO CIUDAD REG. MEDICO N° CORREO ELECTRONICO DIRECCION
CORRESPONDENCIA

INFORMACION DE LA MUESTRA

TIPO DE MUESTRA: Sangre Periférica TIPO DE ANTICUAGULANTE: EDTA HEPARINA

FECHA DE LA TOMA HORA DE LA TOMA: AM PM

VALORACION SOLICITADA PARA: DIAGNOSTICO SEGUIMIENTO

En caso de que sea seguimiento, cuándo y por cuál técnica fue diagnosticado Tratamiento recibido:

INFORMACION CLINICA

Anemia aplásica Hemólisis Hemoglobinuria Síndrome mielodisplásico Aumento de LDH Trombosis Citopenias
Otros , Transfusiones frecuentes SI NO Fecha de última transfusión

COMENTARIOS

RECOMENDACIONES: Las muestras de sangre periférica usadas para diagnóstico o seguimiento de HPN deben ser anticoaguladas con EDTA(tubo lila) y enviadas a la asociación para ser procesadas antes de 24 horas desde su extracción.

INSTRUCCIONES: después de diligenciar completamente este formato, llenar y firmar el consentimiento de acuerdo al tipo de paciente, debe comunicarse para coordinar la cita y la autorización.

BIOPSIAS ADN

TOMA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.

- El material utilizado para Citometría de ADN debe reflejar la composición de la muestra de la que procede.
- distintos tipos de tumores presentan heterogeneidad locorregional, por tanto la muestra deberá ser seleccionada por un patólogo, de tal forma que sea adecuada (componente tumoral neto, cantidad suficiente, ausencia de necrosis, sangre o grasa) y representativa (tomada de distintas regiones y a distinta profundidad).
- para la cuantificación de ADN, la fijación previa del material es innecesaria.

MUCHAS GRACIAS