

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD	Página 1 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024
		VIGENCIA: JUNIO-2027

Fecha: 5/6/2024

Elaborado por:

Dr. Jorge López Villegas, Laboratorio Clínico Hospital Calderón Guardia.
 Dr. Diego Molina Leiva, Laboratorio Clínico Hospital San Juan de Dios.
 Dr. Melvin Calvo Solís, Laboratorio Clínico Hospital Nacional de Niños.
 Dr. Marvin Durán Delgado, Laboratorio Clínico Hospital San Juan de Dios.
 Dra. Rosa Marianela Trejos Herrera, Laboratorio Clínico Hospital México.
 Dr. Juan Carlos Villalobos Ugalde, EAD_ARSDT.
 Dra. Angie Cervantes Rodríguez, Coordinación Nacional de Laboratorios, EAD_ARSDT.

Revisado por: Dr. Mario Mora Ulloa. Jefe Área de Regulación al Diagnóstico y Tratamiento

Avalado por: Dr. Wilburg Díaz Cruz. Gerencia Médica

**Para: Laboratorios Clínicos CCSS.
 Dirección de Red de Servicios de Salud.**

Título: Lineamiento para la estandarización y optimización de las pruebas de citometría de flujo en la Institución.

Justificación:

La citometría de flujo es una técnica basada en la identificación y clasificación de poblaciones celulares en muestras de diferente origen (sangre periférica, médula ósea, líquidos biológicos, biopsias) mediante la caracterización inmunofenotípica de estas células utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos y protocolos estandarizados (1). Actualmente se utiliza a nivel mundial para ayudar en el diagnóstico, clasificación y seguimiento de distintas patologías tales como leucemias agudas, neoplasias de linfocitos maduros, neoplasias de células plasmáticas, hemoglobinuria paroxística nocturna, esferocitosis hereditaria, entre otras. Esta técnica permite además realizar recuentos de poblaciones celulares como es el caso de las células CD34+ en trasplantes de células madre hematopoyéticas (2-4), linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (5,6) y linfocitos B para seguimiento de pacientes en tratamiento con Rituximab. Además, es clave para el estudio inicial de inmunodeficiencias primarias mediante la cuantificación de subpoblaciones linfocitarias y pruebas funcionales (7,8).

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD	Página 2 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024
		VIGENCIA: JUNIO-2027

En la Institución la citometría de flujo se implementó en el año 1995 en el Laboratorio de Estudios Especializados e Investigación del Hospital Nacional de Niños para apoyar el diagnóstico de neoplasias hematológicas en la totalidad de la población atendida por la CCSS. Posteriormente el Hospital San Juan de Dios, incorporó la técnica para la cuantificación de linfocitos T CD4+ en pacientes VIH+.

En las sesiones de trabajo realizadas para analizar la situación de la citometría de flujo en la Institución, se evidenció la necesidad de estandarizar el abordaje de esta técnica en los laboratorios de la CCSS, ya que el procesamiento de las muestras, la configuración y mantenimiento de los equipos, así como el análisis e interpretación de los datos obtenidos por citometría de flujo requiere de un alto grado de entrenamiento y los resultados emitidos tienen serias implicaciones en la salud de los pacientes. Además, se identificaron una serie de oportunidades de mejora que es importante sean abordadas y subsanadas con la finalidad de que sea posible uniformar y mejorar la calidad del servicio ofrecido a los pacientes. Para tales efectos, se valoraron las necesidades de los niveles centrales de mayor complejidad en donde se requiere de esta tecnología para organizar los servicios en una red institucional que favorezca la optimización de los recursos. Finalmente, se analizó la viabilidad de distintas alternativas para asegurar la estandarización del proceso.

Desde el año 2018, se utilizan paneles de anticuerpos modificados y protocolos validados a partir de las recomendaciones del consorcio EuroFlow, uno de los principales referentes a nivel mundial en citometría de flujo clínica (1). En mayo de 2021 se realizó una mejora tecnológica con la implementación de citometría de flujo de nueva generación lo que coloca los estudios realizados en nuestra institución al nivel de los principales centros de diagnóstico y tratamiento de enfermedades onco-hematológicas en el mundo. En vista de lo anterior, se decidió adoptar como referencia la metodología validada por el consorcio EuroFlow.

Por su lado, el laboratorio de histocompatibilidad se centra en el Hospital San Juan de Dios mediante un acuerdo de la Junta directiva de la CCSS que versa "...que la Seroteca Institucional se mantenga y sea fortalecida en el Hospital San Juan de Dios", según lo acordado por la Junta Directiva en el Acuerdo Segundo, Artículo 10 de la Sesión N. 8775, del 7 de mayo de 2015. El espíritu original de este acuerdo es estandarizar y armonizar los procesos asociados a los análisis serológicos y moleculares, facilitar las actividades de coordinación entre los diferentes servicios, mejorar la accesibilidad de los pacientes a los servicios del laboratorio, centralizar el servicio de la seroteca y lograr la sostenibilidad del programa a largo plazo.

Las moléculas del HLA tienen una enorme capacidad de ser reconocidas por el sistema inmunológico, esas pequeñas diferencias que generan el polimorfismo se traducen en un gran potencial inmunogénico que genera el fenómeno que conocemos como aloreactividad. La aloreactividad es una barrera importante en el contexto de los trasplantes de órgano sólido que genera reacciones de rechazo (9,10).

Para minimizar estos riesgos se conocen dos aproximaciones que son complementarias: los estudios de compatibilidad y determinación del riesgo inmunológico, y la inmunosupresión.

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD		Página 3 de 19
	ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024

Los trabajos de Gerhard Opelz en Heidelberg y Stephanie J Lee en CIBMTR han permitido confirmar la importancia de la compatibilidad del HLA en distintos niveles de resolución (9-15).

La Histocompatibilidad nace en el contexto de los trasplantes de órgano sólido y medula ósea como la ciencia que determina la compatibilidad entre dos individuos y estima el riesgo inmunológico asociado al trasplante mediante la caracterización de los antígenos y/o alelos del HLA que portan los receptores y donantes; la determinación de la identidad de los anticuerpos anti HLA que portan los receptores y la estimación del riesgo inmunológico asociado al trasplante que provee los resultados de las pruebas cruzadas (9-15).

Debido al aumento en la complejidad y diversidad de las pruebas, así como, la creciente demanda por el aumento de la población y la incidencia de estas patologías, a partir del año 2016 se estableció una división de citometría de flujo en el Hospital Calderón Guardia y en el 2020 en el Hospital San Juan de Dios. Actualmente en la institución existen 3 divisiones de citometría de flujo en los laboratorios clínicos del Hospital Dr. Rafael Ángel Calderón Guardia, Hospital Nacional de Niños y Hospital San Juan de Dios las cuales realizan pruebas de alta complejidad. Adicionalmente, en el Hospital México se utiliza citometría de flujo para recuento de linfocitos T CD4+ en pacientes VIH+, recuento de células CD34+ y control de leucorreducción en hemocomponentes. El uso de esta tecnología ha permitido mejorar la atención que se brinda a nuestros pacientes al generar mayor exactitud en el diagnóstico lo que deriva en un manejo terapéutico más adecuado.

Objetivo:

Estandarizar la oferta diagnóstica para pruebas de citometría en los laboratorios clínicos de la Institución, así como la red de referencia a los mismos según sus áreas de atracción.

Fundamentación del lineamiento:

En el proceso de discusión se hizo un inventario de las pruebas de citometría de flujo requeridas a nivel institucional para un adecuado manejo de los pacientes por parte de los médicos especialistas de distintos servicios:

Recuento de leucocitos residuales en hemocomponentes

La reducción de leucocitos en hemocomponentes por debajo de niveles establecidos en guías internacionales previene o disminuye eventos adversos de la transfusión tales como reacciones febriles, aloinmunización HLA y transmisión de agentes virales como citomegalovirus (16). Usualmente los valores obtenidos en muestras posteriores a leucorreducción son menores a 25 leucocitos/uL por lo cual se requiere de una técnica

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD	Página 4 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024 VIGENCIA: JUNIO-2027

altamente sensible y reproducible para asegurar el resultado. Actualmente el estándar a nivel mundial es la citometría de flujo debido a su alta capacidad y excelente reproducibilidad intra e interlaboratorio (16). Se han desarrollado kits IVD para este propósito, los cuales se basan en la unión de yoduro de propidio al ADN de células nucleadas utilizando esferas fluorescentes como referencia interna para la cuantificación absoluta de los leucocitos. El uso de citometría de flujo para la cuantificación de leucocitos residuales en hemocomponente podrá sustituirse por otras metodologías IVD capaces de detectar conteos inferiores a 25 leucocitos/uL. Esta determinación también puede realizarse por técnicas similares en el Laboratorio de Hematología siempre y cuando sea utilizando reactivos IVD con aprobación de la FDA o CE.

Recuento de células CD34+ para trasplante de células madre

En el contexto de trasplantes autólogos y trasplantes de médula ósea para pacientes con neoplasias hematológicas, la cuantificación de las células CD34+ presentes en sangre periférica, médula ósea y en los productos de recolección derivados de estas, es clave para determinar el momento más oportuno para la recolección y predecir el éxito del trasplante, así como evaluar la recuperación de la médula ósea (2). En 1996 la International Society of Haemotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) propuso el método más utilizado a nivel mundial para recuento de células CD34, basado en la determinación del porcentaje de células CD34+ en la muestra mediante citometría de flujo de 4 parámetros (FSC, SSC, CD34 y CD45) junto con un recuento de leucocitos totales realizado en un contador hematológico (3). Posteriormente este protocolo fue actualizado incorporando esferas fluorescentes que permiten hacer el recuento absoluto utilizando únicamente el citómetro (3,4) y añadiendo la tinción con 7-aminoactinomicina para evaluar la viabilidad de las células. Existen en el mercado múltiples kits con categoría IVD para realizar esta determinación.

Recuento de linfocitos T CD4+ y CD8+ para pacientes VIH+

En pacientes VIH+ el recuento de linfocitos T CD4+ se incorporó en el manejo clínico desde hace casi 40 años, siendo vital como criterio para iniciar tratamiento, establecer fase de SIDA y evaluar respuesta al tratamiento y progresión de la enfermedad (5). La metodología actual se basa en la cuantificación por citometría de flujo de 6 parámetros (FSC/SSC/CD3/CD45/CD4/CD8) en una sola plataforma con la adición de esferas fluorescentes de referencia interna para obtener recuentos absolutos altamente confiables y reproducibles aún en cantidades menores a 25 células/uL (6). Existen en el mercado múltiples kits con categoría IVD para realizar esta determinación.

Panel para orientación y caracterización de inmunodeficiencias primarias

La utilidad de la citometría de flujo para la cuantificación de poblaciones linfocitarias en sangre periférica y el subsecuente diagnóstico de inmunodeficiencias primarias ha sido

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD	Página 5 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024 VIGENCIA: JUNIO-2027

demostrada previamente (7,8). Esta técnica permite analizar las características de cada subtipo linfocitario tomando en cuenta los patrones de fluorescencia, tamaño celular y complejidad, propios de cada subpoblación celular. La determinación de las diversas subpoblaciones permite el monitoreo, seguimiento y tratamiento de pacientes con alteraciones inmunológicas, así como de individuos con inmunodeficiencias primarias o adquiridas.

Recientemente, el consorcio EuroFlow ha desarrollado y validado combinaciones de anticuerpos monoclonales que en conjunto con sistemas de análisis multiparamétricos enlazados con bases de datos estandarizadas permiten determinar de forma automatizada el recuento absoluto de las distintas subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y correlacionar patrones de disminución o ausencia de una o más subpoblaciones específicas con un tipo de inmunodeficiencia primaria en particular (7–9). Esto representa una ventaja en el diagnóstico de estas enfermedades ya que disminuye el tiempo de respuesta y permite iniciar esquemas de tratamiento previo a la realización de pruebas genéticas más costosas y laboriosas.

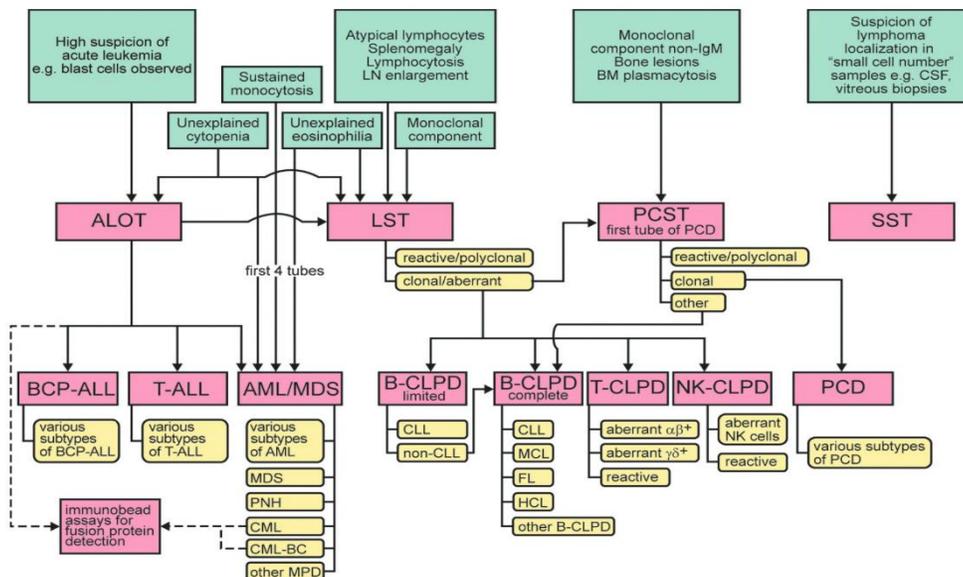
Investigadores asociados al consorcio EuroFlow, utilizando un panel de anticuerpos monoclonales validado y estandarizado denominado Tubo de Orientación para Inmunodeficiencias Primarias (PIDOT, por sus siglas en inglés), han demostrado el valor de esta técnica para la obtención de valores de referencia en individuos sanos de diferentes rangos de edad así como para el diagnóstico certero de pacientes con inmunodeficiencias primarias en sus distintas presentaciones como Síndrome de DiGeorge, Inmunodeficiencia Severa Combinada, Inmunodeficiencia Común Variable, Síndrome de Wiskott-Aldrich y agammaglobulinemia (7,8). Actualmente el panel PIDOT es comercializado en formato CE-IVD y RUO.

Paneles para tamizaje y caracterización de neoplasias hematológicas

Desde hace más de tres décadas, la citometría de flujo ha sido instrumental en apoyar el diagnóstico de las neoplasias hematológicas. Debido a su alta sensibilidad y especificidad, esta técnica se ha vuelto parte integral del abordaje inicial de pacientes con estas enfermedades. Desafortunadamente, por muchos años la citometría de flujo no se realizó de forma estandarizada ya que cada laboratorio utilizaba sus propios paneles de anticuerpos y su propia configuración para los equipos. A partir del 2006, una iniciativa científica apoyada por la Unión Europea denominada EuroFlow se dio a la tarea de estandarizar las pruebas de citometría de flujo clínica (18). En el 2012 publicaron los resultados de su estricto proceso de validación de procedimientos y paneles para neoplasias hematológicas, el cual fue desarrollado en cientos de muestras normales y patológicas (1,18) y que ha sido incorporado por gran cantidad de prestigiosos centros a nivel mundial. Desde esta publicación se disponía de aspectos relevantes para estandarizar estas pruebas siguiendo este modelo, como procedimientos para procesamiento y adquisición de muestras, volúmenes y clones de los



anticuerpos monoclonales, estrategias y software de análisis, entre otros. En Costa Rica también se adoptó esta metodología al ser la única alternativa de estandarización completa que abarca todas las patologías onco-hematológicas publicada en la literatura científica. Los especialistas en hematología y citometría de flujo de la institución han sido formados en centros internacionales asociados a EuroFlow tales como el Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca, España. La metodología EuroFlow se basa en un algoritmo diagnóstico que permite el abordaje secuencial de las muestras lo que deriva en un mejor uso de los recursos disponibles al no tener que realizar un panel extenso de anticuerpos desde un inicio (1).



En los casos en los que se detecta una población de células anormales en alguno de los paneles de tamizaje, el personal a cargo decide cuál es el panel de caracterización más conveniente para completar el estudio y llegar a un diagnóstico específico. Los marcadores utilizados en los paneles de tamizaje y caracterización fueron seleccionados por el consorcio EuroFlow con base en su contribución para discriminar entre sí las distintas patologías. Varias compañías han comercializado la metodología de EuroFlow y actualmente existen opciones con categoría CE-IVD para la gran mayoría de paneles. Además, recientemente se han lanzado paneles en tubos con anticuerpos secos o liofilizados que permiten un mayor grado de estandarización y un menor manejo del inventario ya que cuentan con fechas de expiración superiores a un año (19).

Paneles para enfermedad medible residual de neoplasias hematológicas

La determinación de los niveles de células patológicas que permanecen después del tratamiento en pacientes con neoplasias hematológicas es indispensable para su manejo. Con

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD	Página 7 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024 VIGENCIA: JUNIO-2027

esta información el médico tratante puede intensificar o variar el agente terapéutico en casos en los que el paciente no ha respondido de forma adecuada para tratar de lograr la remisión. Además, en diversos estudios se ha determinado que la enfermedad medible residual es un factor pronóstico independiente en leucemia linfoblástica B y mieloma múltiple (20,21).

La citometría de flujo debido a su alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad es la técnica de elección para el estudio de enfermedad medible residual, principalmente en leucemia linfoblástica B y mieloma múltiple donde puede alcanzar niveles de sensibilidad de 10^{-5} o 10^{-6} comparables con los de las técnicas moleculares (20,21). Para poder alcanzar esta sensibilidad es necesario contar con una metodología estandarizada. El consorcio EuroFlow ha publicado métodos validados para el estudio de enfermedad medible residual en leucemia linfoblástica B y mieloma múltiple, los cuales se utilizan actualmente en los laboratorios de la institución con kits categoría CE-IVD.

En el caso de otras patologías para las cuales es requerido dar seguimiento, pero no existen protocolos completamente estandarizados ni consenso en la comunidad científica (por ejemplo, leucemia mieloide aguda) se deben utilizar paneles y valores de corte generados siguiendo recomendaciones internacionales y verificar su uso en el laboratorio.

Prueba de eosina-5-maleimida para diagnóstico de esferocitosis hereditaria

Las técnicas tradicionales de laboratorio para diagnóstico de esferocitosis hereditarias tales como fragilidad osmótica tienen una baja especificidad y sensibilidad y pueden verse afectadas por factores no relacionados con el defecto de membrana del eritrocito (22). En el año 2000, King y colaboradores publicaron un método por citometría de flujo para la detección de casos de esferocitosis hereditaria mediante la unión de la sustancia fluorescente eosina-5-maleimida a la proteína banda 3 presente en la membrana de los eritrocitos (23). En eritrocitos con alteraciones del citoesqueleto esta unión disminuye, lo cual se puede detectar en el citómetro como una señal de fluorescencia disminuida con respecto a controles normales. Este método es el más utilizado actualmente a nivel mundial para el tamizaje de esferocitosis hereditaria y ha sido validado en múltiples estudios (22-25).

Prueba para detección de células deficientes de GPI en hemoglobinuria paroxística nocturna y desórdenes relacionados

De forma similar a lo que ocurrió con las pruebas de esferocitosis hereditaria, el uso de citometría de flujo para la detección de células deficientes de GPI ha reemplazado las técnicas tradicionales de menor sensibilidad y especificidad como el test de Ham. El método por citometría de flujo se basa en la detección de moléculas unidas a GPI tales como CD14, CD16, CD24, CD55, CD59 y CD157, así como la aerolisina fluorescente (FLAER) la cual se une a distintas moléculas ligadas a GPI. Recientemente esta metodología ha sido validada

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD	Página 8 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024 VIGENCIA: JUNIO-2027

y se han publicado guías internacionales que permiten utilizarla de forma confiable en el ámbito clínico (26-29). Esta prueba es importante para el diagnóstico y seguimiento no solo de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna sino también en pacientes con síndromes de falla medular y neoplasias mielodisplásicas (26).

Prueba cruzada de histocompatibilidad por citometría de flujo

El uso previsto de esta prueba es estimar el riesgo inmunológico asociado a un trasplante. Esta prueba es auxiliar en la selección óptima del par donante receptor, pretende establecer *ex vivo* el riesgo de que ocurra rechazo hiperagudo como consecuencia de un trasplante de órgano sólido. La expresión constitutiva de las moléculas del HLA clase I se da en todas las células nucleadas mientras que las moléculas del HLA clase II en las células presentadoras de antígenos profesionales. Por lo tanto, la elección de los linfocitos T y B como portadores de las moléculas del HLA del donante en su forma nativa y con buenos grados de expresión se ha respaldado por muchos años.

En la prueba cruzada de histocompatibilidad por Citometría de Flujo se mezclan los linfocitos del donante con el suero del receptor, en cantidades que se fijan de conformidad con un procedimiento validado. Se realiza una incubación en agitación para permitir la interacción de los anticuerpos y los antígenos. Posterior a la incubación se realizan ciclos de lavado y centrifugación para retirar todas las moléculas del suero no unidas (incluyendo anticuerpo, inmunocomplejos, fracciones libres del complemento). En el siguiente paso se realiza una tinción basada en anticuerpos monoclonales que permiten analizarla mediante ventanas lógicas. La aproximación más utilizada es emplear Anti-CD45 vs SSC para la selección de linfocitos totales, Anti-CD3 para marcar linfocitos T, Anti-CD19 para marcar linfocitos B y un anticuerpo contra fracción F(ab')₂ de la IgG humana para evidenciar la unión de los anticuerpos donante específico a la superficie de los linfocitos. Se realiza una incubación adicional para permitir la interacción de los anticuerpos con sus respectivas dianas. Finalmente se realizan ciclos de lavado y centrifugación para retirar todos los componentes de la reacción que no se hayan unido a sus dianas y disminuir el ruido de fondo. Finalmente, los linfocitos se resuspenden en buffer de fosfatos (PBS) y se adquieren en un citómetro de flujo para realizar las evaluaciones. El citómetro de flujo alinea las células mediante un enfoque hidrodinámico llevándolas hasta un sitio de interrogación donde las células se clasifican de conformidad con su tamaño y complejidad. En el siguiente sitio de interrogación se evalúa la emisión de fluorescencia de los distintos fluorocromos (deben elegirse fluorocromos compatibles entre sí, para garantizar que no ocurra un exceso de solapamiento entre sus espectros de emisión). La fluorescencia se registra en forma de intensidad media de fluorescencia para cada fluorocromo (MFI). Para la interpretación los analistas deben seleccionar las poblaciones diana en las distintas ventanas lógicas y registrar las fluorescencias. La prueba se interpreta únicamente en el contexto de controles negativos y controles positivos dentro de rango; así como pruebas cruzadas autólogas de donante y receptor. Se recomienda que los valores de MFI obtenidos se transformen a canales de fluorescencia en resolución 1:1024 y se contrasten con los puntos de cortes para linfocito T

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD	Página 9 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024
		VIGENCIA: JUNIO-2027

y Linfocito B obtenidos por el laboratorio mediante la validación interna realizada, de conformidad con el procedimiento sugerido por ASHI (9).

Esta metodología es una forma más sensible de prueba cruzada respecto a su antecesor (CDC). Puede detectar anticuerpos que no fijan el complemento y que están en bajas concentraciones. El método empleado por la CCSS es Halifax. Respecto a las técnicas descritas por ASHI, Bray y Downing (10), Bray (11) y Downing (12), la técnica basada en Halifax mostró una concordancia muy satisfactoria con un R2 de 0.98-0.99. Adicionalmente se realizaron pruebas cruzadas retrospectivas y comparaciones con la técnica de Esferas de antígeno único (SAB, por sus siglas en inglés) obteniendo una especificidad de 95.7% y una sensibilidad de 96.8% respectivamente (15). Como punto de corte en SAB se determinó 2000 MFI, lo cual representa una mejora ante valores sugeridos por otros autores como 3000 para citometría de flujo y 5000 MFI para CDC, independientemente del antígeno evaluado (10).

Estudio de Estallido Respiratorio por DHR

Estudio de inmunodeficiencias causadas por defectos en la actividad fagocítica de los granulocitos neutrófilos. La prueba se basa en la medición del estallido respiratorio oxidativo de los granulocitos neutrófilos después de su estimulación con la bacteria *E. coli* y el PMA (Phorbol12-myristato 13-acetato). En condiciones normales durante el proceso de ingestión bacteriana los fagocitos activan la enzima NADPH oxidasa generando el estallido respiratorio oxidativo. En este proceso se generan iones de hipoclorito dentro de los fagocitos causando la oxidación de la dihidrorodamina 123 (DHR123) haciendo que pase a rodamina 123, la cual es fluorescente y puede ser detectada por medio de citometría de flujo en el mismo canal de lectura que se utiliza para FITC. Este estallido respiratorio se encuentra afectado en la Enfermedad Granulomatosa Crónica, deficiencias de Mieloperoxidasa y de G6PD (30-33).

Estudio de Glicoproteínas Plaquetarias

Estudio inmunofenotípico por medio de citometría de flujo para la identificación de niveles de expresión de las glicoproteínas CD41 (GPIIb) y CD61 (GPIIIa) para el diagnóstico de la trombostenia de Glanzmann. Así como la identificación de niveles de expresión de CD42a (GPIX) y CD42b (GPIb-alfa) para el diagnóstico del síndrome de Bernard-Soulier. Se realiza de forma complementaria con los estudios de agregación plaquetaria. Este estudio se realiza en una muestra de plasma rico en plaquetas (34-36).

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD		Página 10 de 19
	ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024

Descripción del Lineamiento

Oferta de pruebas

En el proceso de discusión del equipo de trabajo se definieron las siguientes pruebas como requeridas para atender de forma adecuada las necesidades de los pacientes de la institución. Las pruebas se dividieron en rutina y referidas según la estadística recopilada de años previos y la capacidad instalada en cada laboratorio según el estudio de oferta y demanda de la citometría de flujo en los hospitales nacionales elaborado por la SubÁrea de Evolución de los Sistemas de Salud Institucional en 2021. En línea con lo expuesto previamente en este documento y con base en que la metodología EuroFlow es la opción más estandarizada, eficiente y con mayor cantidad de opciones IVD o CE-IVD de distintas casas comerciales se elige esta forma de trabajo como la metodología obligatoria para las divisiones de citometría de flujo de la institución.

Adicionalmente se incluye en este lineamiento una sección de pruebas de histocompatibilidad e inmunogenética con la prueba cruzada por citometría de flujo que corresponde a una prueba ligada al programa institucional de donación y trasplante. La elección y ejecución de esta prueba en la institución debe realizarse de acuerdo con los estándares de la Asociación Americana de Histocompatibilidad e Inmunogenética (ASHI) o la Federación Europea de Inmunogenética (EFI) (13,14). El protocolo recomendado es el protocolo Halifax o su modificación Halifaster (15).

Pruebas de rutina
Recuento de leucocitos residuales en hemocomponentes
Recuento de células CD34+ para trasplante de células madre
Recuento de linfocitos T CD4+ y CD8+ para pacientes VIH+ / Linfocitos B y células NK(TBNK)
Panel para orientación de inmunodeficiencias primarias (Panel PIDOT EuroFlow)
Panel para tamizaje de leucemia aguda (Panel ALOT EuroFlow)
Panel para caracterización de leucemia mielóide aguda (Panel AML/MDS Tubo 1 a Tubo 7 EuroFlow)
Panel para caracterización de leucemia linfoblástica B (Panel BCP-ALL EuroFlow)
Panel para tamizaje de líquidos biológicos (Panel SST EuroFlow)
Panel para tamizaje de neoplasia de linfocitos maduros (Panel LST EuroFlow)
Panel para evaluar clonalidad T
Panel para caracterización de neoplasia de linfocitos B maduros (Panel B-CLPD EuroFlow)
Panel para tamizaje de neoplasia de células plasmáticas (Panel PCST EuroFlow)
Panel para caracterización de neoplasia de células plasmáticas (Panel PCD EuroFlow)

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD	Página 11 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024 VIGENCIA: JUNIO-2027

Panel para tamizaje y caracterización de neoplasia mielodisplásica (Panel AML/MDS Tubo 1 a Tubo 4 EuroFlow)
Panel para enfermedad medible residual de leucemia linfoblástica B (Panel BCP-ALL MRD EuroFlow)
Panel para enfermedad medible residual de mieloma múltiple (Panel MM MRD EuroFlow)
Panel para enfermedad medible residual de leucemia mieloide aguda (Panel AML/MDS Tubo 1 a Tubo 4 EuroFlow)
Panel para enfermedad medible residual de neoplasia de linfocitos B maduros (Panel LST y B-CLPD Tubo 1 EuroFlow)
Pruebas referidas
Prueba de eosina-5-maleimida para diagnóstico de esferocitosis hereditaria
Prueba para detección de células deficientes de GPI en hemoglobinuria paroxística nocturna y desórdenes relacionados
Panel para caracterización de células B pre-centro germinal para inmunodeficiencias primarias (Panel PreGC EuroFlow)
Panel para caracterización de células B post centro germinal para inmunodeficiencias primarias (Panel PostGC EuroFlow)
Panel para caracterización de isotipo IgH células B para inmunodeficiencias primarias (Panel IgH-isotype EuroFlow)
Panel para caracterización de células T para inmunodeficiencias primarias (Panel T-cell EuroFlow)
Panel para caracterización de SCID/RTE para inmunodeficiencias primarias (Panel SCID/RTE EuroFlow)
Panel para caracterización de leucemia/linfoma linfoblástico T (Panel T-ALL EuroFlow)
Panel para caracterización de neoplasia de linfocitos T maduros (Panel T-CLPD EuroFlow)
Panel para caracterización de neoplasia de células NK (Panel NK-CLPD EuroFlow)
Estudio de Estallido Respiratorio de Granulocitos por DHR
Estudio de Glicoproteínas Plaquetarias
Determinación de Subpoblaciones de Linfocitos B transicionales/Naive y CD21low.
Determinación de Linfocitos T reguladores y Dobles Negativos
Determinación de Moléculas de Adhesión Leucocitaria (CD18/CD11b/CD44)
Panel de evaluación de los subtipos de monocitos (TiMaScan™)
Pruebas de Inmunogenética e Histocompatibilidad
Prueba cruzada de histocompatibilidad por citometría de flujo

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD	Página 12 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024 VIGENCIA: JUNIO-2027

Distribución de las pruebas por hospital y creación de red institucional

De acuerdo con lo discutido en el equipo técnico, con el fin de resolver de forma eficiente las necesidades diagnósticas y de seguimiento de los pacientes, la División correspondiente de los 4 laboratorios clínicos de los hospitales nacionales deberán ofrecer las pruebas clasificadas como pruebas de rutina en el apartado anterior, con excepción del Hospital Nacional de Niños que por la edad de la población que atiende no requerirá de los paneles para tamizaje y caracterización de neoplasias de células plasmáticas. Cada laboratorio deberá satisfacer las necesidades de su área de atracción asignada por la institución, incluyendo hospitales periféricos con servicio de hematología.

Las pruebas referidas se asignaron a los hospitales según criterios de capacidad instalada, experiencia e incidencia anual para usar racionalmente los recursos. Cualquier prueba o metodología distinta a las descritas en este documento o mejoras tecnológicas deben ser aprobada por el equipo técnico institucional de citometría de flujo y la Coordinación Nacional de Laboratorios previo a su implementación.

En el caso de los estudios de caracterización de neoplasias de células T y NK maduras, así como de leucemia/linfoma linfoblástico T/NK, se realizará un estudio de tamizaje en cada hospital (paneles ALOT EuroFlow o LST EuroFlow según corresponda), previo al envío de las muestras al hospital de referencia.

Las pruebas de Inmunogenética e Histocompatibilidad donde se incluye la prueba cruzada por citometría de flujo será ofertada por el laboratorio de inmunología del Hospital San Juan de Dios, que es el laboratorio que presta el servicio institucional de laboratorio de inmunogenética e histocompatibilidad al programa institucional de donación y trasplante.

Para unificar las compras y procesos administrativos y mejorar la eficiencia de los procedimientos de laboratorio, se recomienda establecer una única área de citometría de flujo en la División de Hematología Especializada de cada laboratorio clínico de los hospitales nacionales para controlar la cantidad de licitaciones y equipos que existen actualmente, reducir costos y asegurar la calidad de los resultados. Estas áreas asumirían todos los ensayos de citometría de flujo que se realizan actualmente en otras divisiones como Inmunología (recuento de linfocitos T CD4+ para pacientes VIH+) y Banco de Sangre (recuento de leucocitos residuales en hemocomponentes, recuento de células CD34+ para trasplante de médula ósea) con excepción de las pruebas de inmunogenética e histocompatibilidad HLA para trasplante las cuales se realizarán en la división de inmunología, laboratorio de histocompatibilidad e inmunogenética del Hospital San Juan de Dios que es actualmente el centro de referencia institucional. Esto por cuanto las pruebas de mayor complejidad son las relacionadas con las neoplasias hematológicas, y por su parte las pruebas de recuento de linfocitos T CD4+ y CD8+, linfocitos TBNK, recuento de leucocitos residuales en hemocomponentes y recuento de células CD34+ están altamente automatizadas, constituyen un tiempo de utilización menor de los equipos y permiten integrarse en el flujo de trabajo de

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD			Página 13 de 19
	ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024	VIGENCIA: JUNIO-2027

las divisiones de hematología especializada aprovechando la cantidad de equipos instalados para realizar la totalidad de las pruebas requeridas, reduciendo tiempo de procesamiento y costos de pruebas. Además, el personal más capacitado y de mayor experiencia en la institución en cuanto a la técnica de citometría de flujo se encuentra en las divisiones de hematología especializada; razón por la cual las pruebas de citometría de flujo deberán realizarse por Microbiólogos y Químicos Clínicos Especialista en Hematología, con excepción de la prueba cruzada de histocompatibilidad por citometría de flujo en virtud de lo cual los especialistas en inmunología clínica y hematología de la institución debidamente capacitados son los idóneos para realizar y supervisar su ejecución así como proveer una interpretación y valoración adecuada del riesgo inmunológico en combinación con el resto de pruebas que componen dicha evaluación.

Se recomienda planificar la implementación de una licitación nacional de citometría de flujo que incluya todas las pruebas realizadas en los hospitales nacionales para unificar compras y reducir costos. Las especificaciones técnicas serían realizadas por el equipo técnico de citometría de flujo de la institución siguiendo los criterios de EuroFlow como referencia científica.

Prueba	Hospital			
	HCG	HSJD	HNN	HM
RECUENTO LINFOCITOS T CD4+ Y T CD8+ PARA PACIENTES VIH+	X	X	X	X4
RECUENTO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS (TBNK)	X	X	X	X
TAMIZAJE INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS (PANEL PIDOT EUROFLOW)	X	X	X	X
CARACTERIZACIÓN INMUNODEFICIENCIA DE CÉLULAS B PANEL PRE-CENTRO GERMINAL		X	X	
CARACTERIZACIÓN INMUNODEFICIENCIA DE CÉLULAS B PANEL POST CENTRO GERMINAL		X	X	
CARACTERIZACIÓN INMUNODEFICIENCIA DE CÉLULAS B PANEL ISOTIPO IgH		X	X	
CARACTERIZACIÓN INMUNODEFICIENCIA DE CÉLULAS T / T REGULADORAS /DOBLES NEGATIVAS		X	X	
CARACTERIZACIÓN INMUNODEFICIENCIA PANEL SCID/RTE		X	X	
RECUENTO DE CÉLULAS CD34+ PARA TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE	X	X	X	X
RECUENTO DE LEUCOCITOS RESIDUALES EN HEMOCOMPONENTES	X	X	X	X
TAMIZAJE LEUCEMIA AGUDA (PANEL ALOT EUROFLOW)	X	X	X	X
CARACTERIZACIÓN LEUCEMIA/LINFOMA LINFOBLÁSTICO B (PANEL BCP-ALL EUROFLOW)	X	X	X	X
ENFERMEDAD MEDIBLE RESIDUAL DE LEUCEMIA/LINFOMA LINFOBLÁSTICO B (PANEL BCP-ALL MRD EUROFLOW)	X	X	X	X
CARACTERIZACIÓN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (PANEL AML/MDS T1-T7 EUROFLOW)	X	X	X	X

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD			Página 14 de 19
	ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024	VIGENCIA: JUNIO-2027

ENFERMEDAD MEDIBLE RESIDUAL DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (PANEL AML/MDS T1-T4 EUROFLOW)	X	X	X	X
CARACTERIZACIÓN LEUCEMIA/LINFOMA LINFOBLÁSTICO T/NK (PANEL T-ALL EUROFLOW)			X	
ENFERMEDAD MEDIBLE RESIDUAL DE LEUCEMIA/LINFOMA LINFOBLÁSTICO T (PANEL T-ALL EUROFLOW)			X	
TAMIZAJE Y CARACTERIZACIÓN NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA (PANEL AML/MDS T1-T4 EUROFLOW)	X	X	X	X
TAMIZAJE LÍQUIDOS BIOLÓGICOS (PANEL SST EUROFLOW)	X	X	X	X
TAMIZAJE NEOPLASIA DE LINFOCITOS MADUROS (PANEL LST EUROFLOW)	X	X	X	X
CARACTERIZACIÓN NEOPLASIA DE LINFOCITOS MADUROS B (PANEL B-CLPD EUROFLOW)	X	X	X	X
ENFERMEDAD MEDIBLE RESIDUAL DE NEOPLASIA DE LINFOCITOS B MADUROS (PANELES LST Y B-CLPD T1 EUROFLOW)	X	X	X	X
CARACTERIZACIÓN NEOPLASIA DE LINFOCITOS MADUROS T (PANEL T-CLPD EUROFLOW)	X			
ENFERMEDAD MEDIBLE RESIDUAL DE NEOPLASIA DE LINFOCITOS T MADUROS (PANEL T-CLPD EUROFLOW)	X			
CARACTERIZACIÓN NEOPLASIA DE CÉLULAS NK (PANEL NK-CLPD EUROFLOW)	X			
ENFERMEDAD MEDIBLE RESIDUAL DE NEOPLASIA DE LINFOCITOS NK MADUROS (PANEL NK-CLPD EUROFLOW)	X			
TAMIZAJE NEOPLASIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS (PANEL PCST EUROFLOW)	X	X		X
CARACTERIZACIÓN NEOPLASIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS (PANEL PCD EUROFLOW)	X	X		X
ENFERMEDAD MEDIBLE RESIDUAL DE NEOPLASIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS (PANEL MM MRD EUROFLOW)	X	X		X
DETECCIÓN DE CÉLULAS DEFICIENTES DE GPI		X		
DETERMINACIÓN DE EOSINA-5-MALEIMIDA PARA DIAGNÓSTICO DE ESFEROCITOSIS HEREDITARIA			X	
PRUEBA CRUZADA POR CITOMETRÍA DE FLUJO		X		
ESTALLIDO RESPIRATORIO DE GRANULOCITOS POR DHR			X	
ESTUDIO DE GLICOPROTEÍNAS PLAQUETARIAS			X	
PANEL DE EVALUACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE MONOCITOS (TiMaScan™)		X		

Procedimiento para envío de muestras a citometría de flujo

Para evitar el uso inadecuado de los recursos institucionales y por la complejidad de las pruebas de citometría de flujo, se recomienda restringir la solicitud de estos estudios a médicos especialistas. En el caso de estudios para neoplasias hematológicas o inmunodeficiencias primarias se deberá realizar interconsulta con los médicos especialistas

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD	Página 15 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024 VIGENCIA: JUNIO-2027

de Hematología o Inmunología (según corresponda) para valorar si amerita realizarse la prueba.

En referencia a la prueba cruzada por citometría de flujo la prueba está destinada para los programas de donante vivo y donante cadavérico ligados al programa institucional de donación y trasplante, de modo que es de uso para especialistas en nefrología, neumología, hematología y cardiología, así como los coordinadores institucionales. Para detalles sobre él envío de muestras referirse al documento “Información para los usuarios sobre los requerimientos para el envío y análisis de muestras para propósitos de Histocompatibilidad e Inmunogenética”

Controles de calidad externos

Se recomienda que todos los laboratorios que realicen pruebas de citometría de flujo deben contar con al menos un control de calidad externo acreditado que permita evaluar su desempeño analítico.

En referencia a la prueba cruzada por citometría de flujo los laboratorios deberán seguir los lineamientos de ASHI o EFI (en su defecto), donde se indica que el laboratorio debe participar al menos en dos rondas anuales compuestas de mínimo dos células diferentes con 5 sueros incógnitos y proveer un reporte de acuerdo con los lineamientos de las organizaciones supracitadas.

Las pruebas referidas serán asumidas por los distintos hospitales asignados.

Se debe instruir a las jefaturas de los distintos laboratorios clínicos que realicen las gestiones necesarias para unificar las licitaciones actuales de citometría de flujo evitando cualquier afectación a los pacientes. Se gestionará la reorganización de las divisiones de hematología especializada y el laboratorio de inmunología que funcione como centro nacional de referencia para el programa institucional de donación y trasplante, de forma que tengan el espacio físico, infraestructura y personal especializado para asumir todas las pruebas de citometría de otras divisiones.

Responsable del cumplimiento:

Directores Laboratorios Clínicos del Hospital San Juan de Dios, Hospital México, Hospital Nacional de Niños, Hospital Calderón Guardia.

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD	Página 16 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024 VIGENCIA: JUNIO-2027

Responsable de verificar el cumplimiento:

Coordinación Nacional de Laboratorios. Área de Regulación y Sistematización del Diagnóstico y el tratamiento.

Contacto para consultas:

Dr. Jorge López Villegas, Hospital Calderón Guardia.
 jlopezv@ccss.sa.cr
 Dr. Juan Carlos Villalobos, EAD
 jcvillal@ccss.sa.cr
 Dra. Angie Cervantes, Coordinación Nacional de Laboratorios
 avcervan@ccss.sa.cr

Referencias

1. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, Van Der Velden VHJ, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. septiembre de 2012;26(9):1908-75.
2. Gajkowska A, Oldak T, Jastrzevska M, Machaj EK, Walewski J, Kraszewska E, et al. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods.
3. Barnett D, Janossy G, Lubenko A, Matutes E, Newland A, Reilly JT. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34 + haematopoietic stem cells PREPARED BY THE CD34 + HAEMATOPOIETIC STEM CELL WORKING PARTY*: CD34 + Haematopoietic Stem Cell Working Party. *Clin Lab Haematol*. octubre de 1999;21(5):301-8.
4. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Cytometry*. 15 de abril de 1998;34(2):61-70.
5. Hoffman J, Van Griensven J, Colebunders R, McKellar M. Role of the CD4 count in HIV management. *HIV Ther*. enero de 2010;4(1):27-39.

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD		Página 17 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024	VIGENCIA: JUNIO-2027

6. Wade D, Daneau G, Aboud S, Vercauteren GH, Urassa WSK. WHO Multicenter Evaluation of FACSCount CD4 and Pima CD4 T-Cell Count Systems: Instrument Performance and Misclassification of HIV-Infected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2014;66(5).
7. Van Der Burg M, Kalina T, Perez-Andres M, Vlkova M, Lopez-Granados E, Blanco E, et al. The EuroFlow PID Orientation Tube for Flow Cytometric Diagnostic Screening of Primary Immunodeficiencies of the Lymphoid System. *Front Immunol.* 4 de marzo de 2019;10:246.
8. Van Dongen JJM, Van Der Burg M, Kalina T, Perez-Andres M, Mejstrikova E, Vlkova M, et al. EuroFlow-Based Flowcytometric Diagnostic Screening and Classification of Primary Immunodeficiencies of the Lymphoid System. *Front Immunol.* 13 de junio de 2019;10:1271.
9. Land, G. A., Strothman, R. M., Blanck, C. E., Phelan, D. L., & Hew, M. T. (2000). Laboratory ASHI Manual. In American society of histocompatibility.
10. Bray, R. A. (2013). Lymphocyte crossmatching by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 1034, 285–296. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-493-7_14
11. Fleischhauer, K., Horn, P. A., & Harmer, A. (2018). Immunogenetics Laboratory. In *Establishing a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit* (pp. 111–128). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59358-6_8
12. Alheim, M., Paul, P. K., Hauzenberger, D. M., & Wikström, A. C. (2015). Improved flow cytometry based cytotoxicity and binding assay for clinical antibody HLA crossmatching. *Human Immunology*, 76(11), 849–857. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.09.047>
13. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. (2022). ASHI Accreditation website. <http://www.ashi-hla.org/?page=Accreditation>
14. European Federation of Immunogenetics. (2022, January 22). EFI Accreditation website. <http://www.efiweb.eu/efi-committees/accreditation-committee.html>
15. Liwski, R. S., Greenshields, A. L., Conrad, D. M., Murphey, C., Bray, R. A., Neumann, J., & Gebel, H. M. (2018). Rapid optimized flow cytometric crossmatch (FCXM) assays: The Halifax and Halifaster protocols. *Human Immunology*, 79(1), 28–38. <https://doi.org/10.1016/J.HUMIMM.2017.10.020>
16. Zeng Y, Dabay M, George V, Seetharaman S, De Arruda Indig M, Graminske S, et al. Comparison of Flow Cytometric Methods for the Enumeration of Residual Leucocytes in Leucoreduced Blood Products: A Multicenter Study. *Cytometry A.* abril de 2018;93(4):420-6.
17. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, et al. Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B*

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD	Página 18 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024 VIGENCIA: JUNIO-2027

- Clin Cytom [Internet]. enero de 2010 [citado 7 de diciembre de 2023];78B(S1). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.20547>
18. Van Dongen JJM, Orfao A. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia*. septiembre de 2012;26(9):1899-907.
 19. Van Der Velden VHJ, Flores-Montero J, Perez-Andres M, Martin-Ayuso M, Crespo O, Blanco E, et al. Optimization and testing of dried antibody tube: The EuroFlow LST and PIDOT tubes as examples. *J Immunol Methods*. diciembre de 2019;475:112287.
 20. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, Van Der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 19 de enero de 2017;129(3):347-57.
 21. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. octubre de 2017;31(10):2094-103.
 22. Stoya G, Gruhn B, Vogelsang H, Baumann E, Linss W. Flow Cytometry as a Diagnostic Tool for Hereditary Spherocytosis. *Acta Haematol*. 2006;116(3):186-91.
 23. King M, Behrens J, Rogers C, Flynn C, Greenwood D, Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. *Br J Haematol*. diciembre de 2000;111(3):924-33.
 24. Hunt L, Greenwood D, Heimpel H, Noel N, Whiteway A, King MJ. Towards the harmonization of result presentation for the eosin-5'-maleimide (EMA) binding test in the diagnosis of hereditary spherocytosis: Feasibility of harmonizing EMA binding results. *Cytometry B Clin Cytom*. septiembre de 2014;n/a-n/a.
 25. Kar R, Mishra P, Pati HP. Evaluation of eosin-5-maleimide flow cytometric test in diagnosis of hereditary spherocytosis. *Int J Lab Hematol*. febrero de 2010;32(1p2):8-16.
 26. Dezern AE, Borowitz MJ. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 1 – Clinical Utility. *Cytometry B Clin Cytom*. enero de 2018;94(1):16-22.
 27. Illingworth A, Marinov I, Sutherland DR, Wagner-Ballon O, DelVecchio L. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 3 – Data Analysis, Reporting and Case Studies. *Cytometry B Clin Cytom*. enero de 2018;94(1):49-66.
 28. Oldaker T, Whitby L, Saber M, Holden J, Wallace PK, Litwin V. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal

	CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL GERENCIA MÉDICA DIRECCIÓN DE DESARROLLO DE SERVICIOS DE SALUD	Página 19 de 19
ÁREA DE REGULACIÓN Y SISTEMATIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO. EQUIPO TÉCNICO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	LINEAMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA INSTITUCIÓN	CÓDIGO: L.GM.DDSS.ARSDT-EAD-05062024 VIGENCIA: JUNIO-2027

- Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 4 – Assay Validation and Quality Assurance. *Cytometry B Clin Cytom.* enero de 2018;94(1):67-81.
29. Sutherland DR, Illingworth A, Marinov I, Ortiz F, Andreasen J, Payne D, et al. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 2 – Reagent Selection and Assay Optimization for High-Sensitivity Testing. *Cytometry B Clin Cytom.* enero de 2018;94(1):23-48.
 30. Kuhns DB: Diagnostic testing for chronic granulomatous disease. *Methods Mol Biol.* 2019;1982:543-571.
 31. Knight V, Heimall JR, Chong H, et al: A toolkit and framework for optimal laboratory evaluation of individuals with suspected primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021 Sep;9(9):3293-3307.e6
 32. Lehmann AK, Sornes S, Halstensen A. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000; 243(1-2):229-242.
 33. Dinauer MC. Chronic Granulomatous Disease and other disorders of phagocyte function. *Hematology* 2005; 2005(1): 89-95.
 34. Spurgeon BEJ, and Naseem KM. Platelet Flow Cytometry: Instrument Setup, Controls, and Panel Performance. *Cytometry Part B* 2020; 98B: 19–27.
 35. Antoine Babuty , Camille Debord , Marie C. Béné & Marc Fouassier (2020): Flow cytometry for platelets, EDTA or not EDTA: what is the answer?, *Platelets*, DOI: 10.1080/09537104.2020.1823361
 36. Sandes AF, Yamamoto M, Matarraz S, Chauffaille ML, Quijano S, López A, Oguro T, Kimura EYS, and Orfao A. Altered immunophenotypic features of peripheral blood platelets in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2012;97(6):895-902. doi:10.3324/haematol.2011.057158