

Protección radiológica

Criterios de funcionamiento para laboratorios que utilizan el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en los linfocitos de la sangre periférica para dosimetría biológica

(ISO 17099:2014)

Esta norma ha sido elaborada por el comité técnico CTN 73 *Energía nuclear, tecnologías nucleares y protección radiológica*, cuya secretaría desempeña UNE.

UNE-EN ISO 17099

Protección radiológica
Criterios de funcionamiento para laboratorios que utilizan el ensayo de
micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en los linfocitos de la
sangre periférica para dosimetría biológica
(ISO 17099:2014)

*Radiological protection. Performance criteria for laboratories using the cytokinesis block
micronucleus (CBMN) assay in peripheral blood lymphocytes for biological dosimetry
(ISO 17099:2014).*

*Radioprotection. Critères de performance pour les laboratoires pratiquant la dosimétrie biologique
par le test des micronoyaux avec blocage de la cytotélerèse (CBMN) dans les lymphocytes du sang
périphérique (ISO 17099:2014).*

Esta norma es la versión oficial, en español, de la Norma Europea EN ISO 17099:2017, que
a su vez adopta la Norma Internacional ISO 17099:2014.

Las observaciones a este documento han de dirigirse a:

Asociación Española de Normalización

Génova, 6
28004 MADRID-España
Tel.: 915 294 900
info@une.org
www.une.org
Depósito legal: M 11978:2018

© UNE 2018
Publicado por AENOR INTERNACIONAL S.A.U. bajo licencia de la Asociación Española de Normalización.
Reproducción prohibida

ICS 13.280

Versión en español

Protección radiológica
Criterios de funcionamiento para laboratorios que utilizan el ensayo
de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en los
linfocitos de la sangre periférica para dosimetría biológica
(ISO 17099:2014)

Radiological protection. Performance
criteria for laboratories using the
cytokinesis block micronucleus (CBMN)
assay in peripheral blood lymphocytes
for biological dosimetry
(ISO 17099:2014).

Radioprotection. Critères de
performance pour les laboratoires
pratiquant la dosimétrie biologique par
le test des micronoyaux avec blocage de
la cytotodiérèse (CBMN) dans les
lymphocytes du sang périphérique
(ISO 17099:2014).

Esta norma europea ha sido aprobada por CEN el 2017-09-13.

Los miembros de CEN están sometidos al Reglamento Interior de CEN/CENELEC que define las condiciones dentro de las cuales debe adoptarse, sin modificación, la norma europea como norma nacional. Las correspondientes listas actualizadas y las referencias bibliográficas relativas a estas normas nacionales pueden obtenerse en el Centro de Gestión de CEN/CENELEC, o a través de sus miembros.

Esta norma europea existe en tres versiones oficiales (alemán, francés e inglés). Una versión en otra lengua realizada bajo la responsabilidad de un miembro de CEN en su idioma nacional, y notificada al Centro de Gestión de CEN/CENELEC, tiene el mismo rango que aquéllas.

Los miembros de CEN son los organismos nacionales de normalización de los países siguientes: Alemania, Antigua República Yugoslava de Macedonia, Austria, Bélgica, Bulgaria, Chipre, Croacia, Dinamarca, Eslovaquia, Eslovenia, España, Estonia, Finlandia, Francia, Grecia, Hungría, Irlanda, Islandia, Italia, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Malta, Noruega, Países Bajos, Polonia, Portugal, Reino Unido, República Checa, Rumanía, Serbia, Suecia, Suiza y Turquía.



COMITÉ EUROPEO DE NORMALIZACIÓN
European Committee for Standardization
Comité Européen de Normalisation
Europäisches Komitee für Normung
CENTRO DE GESTIÓN: Rue de la Science, 23, B-1040 Brussels, Belgium

© 2017 CEN. Derechos de reproducción reservados a los Miembros de CEN.

Índice

Prólogo europeo	6
Declaración.....	6
Prólogo	7
0 Introducción.....	8
1 Objeto y campo de aplicación.....	8
2 Términos y definiciones.....	9
3 Metodología del ensayo del micronúcleo utilizada en esta norma	11
3.1 Generalidades.....	11
3.2 Requisitos generales del laboratorio	12
3.3 Solicitudes para el análisis y la toma de muestras de sangre	12
3.4 Cultivo de células.....	13
3.5 Tinción.....	14
3.6 Microscopia	14
3.7 Recuento visual de los portaobjetos.....	14
3.8 Análisis automático	15
4 Confidencialidad de la información personal	16
4.1 Resumen	16
4.2 Aplicaciones del principio de confidencialidad	16
5 Requisitos de seguridad del laboratorio	17
5.1 Resumen	17
5.2 Requisitos de seguridad microbiológica.....	17
5.3 Requisitos de seguridad química.....	18
5.4 Requisitos de seguridad óptica	19
5.5 Plan de seguridad.....	19
6 Fuente(s) de calibración, curva de calibración y dosis mínima detectable.....	19
6.1 Fuente(s) de calibración	19
6.2 Curva de calibración.....	20
6.3 Frecuencia de fondo de los micronúcleos	21
6.4 Medición de la dosis mínima detectable	21
7 Responsabilidad del cliente.....	22
8 Responsabilidad del laboratorio CBMN	22
8.1 Implantación y mantenimiento del programa de garantía de calidad	22
8.2 Responsabilidad durante el servicio.....	23
9 Sobreexposición accidental de pocos individuos	24
9.1 Procedimiento para el recuento de micronúcleos en células binucleadas.....	24
9.2 Criterios para la conversión de una tasa de micronúcleos en una estimación de la dosis absorbida.....	25

9.3	Informe de resultados	26
10	Clasificación de la población	28
10.1	Generalidades.....	28
10.2	Utilización de una red de ensayo CBMN para exposiciones a gran escala.....	28
10.3	Procedimiento para el recuento de micronúcleos en células binucleadas.....	28
10.4	Criterios para la conversión de una tasa de micronúcleos en una estimación de la dosis absorbida.....	28
10.5	Informe de resultados	29
11	Garantía de la calidad y control de calidad	29
11.1	Resumen	29
11.2	Garantía de la calidad	29
11.3	Control de calidad	29
Anexo A (Informativo)	Hoja de datos de ejemplo para el recuento de los micronúcleos en células binucleadas	32
Anexo B (Informativo)	Automatización del recuento de micronúcleos	33
Anexo C (Informativo)	Instrucciones para el cliente (muestra)	36
Anexo D (Informativo)	Cuestionario de ejemplo	38
Anexo E (Informativo)	Ejemplo de informe para evaluación individual	40
Anexo F (Informativo)	Ejemplo de informe para un grupo de individuos	41
Bibliografía		43

Prólogo europeo

El texto de la Norma ISO 17099:2014 del Comité Técnico ISO/TC 85 *Energía nuclear, tecnologías nucleares y protección radiológica*, de la Organización Internacional de Normalización (ISO), ha sido adoptado como Norma EN ISO 17099:2017 por el Comité Técnico CEN/TC 430 *Energía nuclear, tecnologías nucleares y protección radiológica*, cuya Secretaría desempeña AFNOR.

Esta norma europea debe recibir el rango de norma nacional mediante la publicación de un texto idéntico a ella o mediante ratificación antes de finales de abril de 2018, y todas las normas nacionales técnicamente divergentes deben anularse antes de finales de abril de 2018.

Se llama la atención sobre la posibilidad de que algunos de los elementos de este documento estén sujetos a derechos de patente. CEN no es responsable de la identificación de dichos derechos de patente.

De acuerdo con el Reglamento Interior de CEN/CENELEC, están obligados a adoptar esta norma europea los organismos de normalización de los siguientes países: Alemania, Antigua República Yugoslava de Macedonia, Austria, Bélgica, Bulgaria, Chipre, Croacia, Dinamarca, Eslovaquia, Eslovenia, España, Estonia, Finlandia, Francia, Grecia, Hungría, Irlanda, Islandia, Italia, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Malta, Noruega, Países Bajos, Polonia, Portugal, Reino Unido, República Checa, Rumanía, Serbia, Suecia, Suiza y Turquía.

Declaración

El texto de la Norma ISO 17099:2014 ha sido aprobado por CEN como Norma EN ISO 17099:2017 sin ninguna modificación.

Prólogo

ISO (Organización Internacional de Normalización) es una federación mundial de organismos nacionales de normalización (organismos miembros de ISO). El trabajo de preparación de las normas internacionales normalmente se realiza a través de los comités técnicos de ISO. Cada organismo miembro interesado en una materia para la cual se haya establecido un comité técnico, tiene el derecho de estar representado en dicho comité. Las organizaciones internacionales, públicas y privadas, en coordinación con ISO, también participan en el trabajo. ISO colabora estrechamente con la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC) en todas las materias de normalización electrotécnica.

En la parte 1 de las Directivas ISO/IEC se describen los procedimientos utilizados para desarrollar esta norma y para su mantenimiento posterior. En particular debería tomarse nota de los diferentes criterios de aprobación necesarios para los distintos tipos de documentos ISO. Esta norma se redactó de acuerdo a las reglas editoriales de la parte 2 de las Directivas ISO/IEC. www.iso.org/directives.

Se llama la atención sobre la posibilidad de que algunos de los elementos de este documento puedan estar sujetos a derechos de patente. ISO no asume la responsabilidad por la identificación de cualquiera o todos los derechos de patente. Los detalles sobre cualquier derecho de patente identificado durante el desarrollo de esta norma se indican en la introducción y/o en la lista ISO de declaraciones de patente recibidas. www.iso.org/patents.

Cualquier nombre comercial utilizado en esta norma es información que se proporciona para comodidad del usuario y no constituye una recomendación.

Para obtener una explicación sobre el significado de los términos específicos de ISO y expresiones relacionadas con la evaluación de la conformidad, así como información de la adhesión de ISO a los principios de la Organización Mundial del Comercio (OMC) respecto a los Obstáculos Técnicos al Comercio (OTC), véase la siguiente dirección: www.iso.org/iso/foreword.html.

El comité responsable de esta norma es el ISO/TC 85, *Energía nuclear, tecnologías nucleares y protección radiológica*, Subcomité SC 2, *Protección radiológica*.

0 Introducción

El propósito de esta norma internacional es definir el uso del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en los linfocitos de la sangre periférica humana para dosimetría biológica de la exposición a la radiación ionizante. Este ensayo pretende aplicarse para exposiciones accidentales o malintencionadas que implican a) hasta unas pocas víctimas para proporcionar estimaciones de la dosis completa en individuos o b) en un modo de clasificación según prioridad para proporcionar estimaciones de la dosis provisional para los individuos de una población.

El ensayo CBMN es una técnica citogenética alternativa, que posiblemente es más simple y más rápida de realizar que el ensayo dicéntrico (Normas ISO 19238:2014 e ISO 21243:2008). Habitualmente se utiliza para demostrar la exposición a agentes genotóxicos, distintos de las radiaciones ionizantes, que no están cubiertos en esta norma internacional. Aunque el cultivo de las muestras de sangre es ligeramente más largo que para los dicéntricos, es más fácil el recuento de los micronúcleos en los linfocitos binucleados.

Como se hizo con el ensayo dicéntrico, el ensayo CBMN ha sido adaptado para la clasificación según prioridad de emergencia en caso de accidentes de radiación con numerosas víctimas. El volumen de sangre requerido para el recuento de un número suficiente de células binucleadas es similar al requerido para el ensayo dicéntrico. Una vez más, la más rápida velocidad del recuento de los micronúcleos compensa la extensión del tiempo de cultivo. Además, puede realizarse el ensayo CBMN de una forma automática.

Esta norma internacional proporciona una guía sobre cómo realizar el ensayo CBMN para la evaluación de la dosis utilizando procedimientos documentados y validados. La evaluación de la dosis utilizando el ensayo CBMN tiene relevancia en la gestión médica, gestión de la protección frente la radiación, en el mantenimiento de registros y en los requisitos médicos/legales. Esta norma internacional se divide en dos partes, según el uso del ensayo CBMN: exposición a la radiación de unos pocos individuos o clasificación según prioridad de la población en un gran evento radiológico.

Una parte de la información de esta norma internacional está incluida en otras directrices internacionales y publicaciones científicas, sobre todo en la serie de informes técnicos del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA/IAEA) sobre dosimetría biológica. Sin embargo, esta norma internacional amplía y normaliza la garantía y el control de calidad, los criterios de acreditación y la evaluación del funcionamiento. Esta norma internacional es generalmente compatible con la Norma ISO/IEC 17025 *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración* con especial consideración a las necesidades específicas de la dosimetría biológica. La expresión de las incertidumbres en las estimaciones de la dosis dada en esta norma internacional cumple con la "Guía ISO para la expresión de la incertidumbre de la medición" (antiguo GUM) y con todas las partes de la Norma ISO 5725.

1 Objeto y campo de aplicación

Esta norma internacional aborda lo siguiente:

- a) confidencialidad de la información personal para el cliente y el laboratorio;
- b) requisitos de seguridad del laboratorio;

- c) las fuentes de radiación, las tasas de las dosis y los intervalos utilizados para el establecimiento de las curvas dosis-efecto de la calibración de referencia que permiten la estimación de las dosis a partir de los resultados del ensayo CBMN, así como la dosis mínima detectable;
- d) el desempeño de la extracción de sangre, cultivo, recogida y preparación de muestras para recuento del ensayo CBMN;
- e) criterios de recuento;
- f) conversión de la frecuencia de los micronúcleos en las células binucleadas a una estimación de la dosis absorbida;
- g) informe de los resultados;
- h) garantía y control de calidad;
- i) anexos informativos que contienen ejemplos de un cuestionario, de instrucciones para los clientes, una hoja de datos de recuento en microscopio, un ejemplo de informe y consejos sobre los puntos fuertes y débiles de los sistemas automáticos actuales para el recuento de micronúcleos automático.

2 Términos y definiciones

Para los fines de este documento, se aplican los términos y definiciones siguientes:

2.1 acéntrico:

Fragmento de cromosoma de tamaño variable.

NOTA 1 Cuando se forma independientemente de una aberración cromosómica de tipo dicéntrica o anillo céntrico, generalmente se le conoce como un acéntrico en exceso.

2.2 nivel de fondo:

Frecuencia espontánea (o número) de micronúcleos recontados en el control de muestras o individuos.

2.3 sesgo:

Error estadístico de la toma de muestra o del ensayo causado por favorecer sistemáticamente algunos resultados sobre otros.

2.4 células binucleadas:

Células que han completado una división nuclear después de estimulación mitógena y tipo de célula en la que recuentan los micronúcleos.

NOTA 1 Estas células se acumulan en el cultivo utilizando la citocalasina-B, que es un inhibidor de la citocinesis.

2.5 laboratorio CBMN:

Laboratorio que realiza las mediciones de dosimetría biológica utilizando el ensayo CBMN.

2.6 anillo céntrico:

Cromosoma circular aberrante resultante de la unión de dos brazos rotos o separados del mismo cromosoma, generalmente acompañado por un fragmento acéntrico.

2.7 centrómero:

Región especializada de un cromosoma que tiene una restricción que une a dos cromátidas hermanas y que aparece durante la mitosis.

2.8 cromosoma:

Estructura que tiene la información genética.

NOTA 1 Normalmente, los núcleos de las células humanas contienen 46 de estas estructuras. Durante la división nuclear, éstas condensan para formar elementos de forma característica.

2.9 cromátida:

Cualquiera de las dos hélices de un cromosoma duplicado que se unen por un centrómero individual.

NOTA 1 Cromátidas separadas durante la mitosis para convertirse en un cromosoma individual.

2.10 intervalo de confianza:

Intervalo estadístico sobre una cantidad estimada dentro de la cual el valor de la cantidad se espera que se encuentre con una probabilidad especificada.

2.11 citocalasina-B, cito-B:

Reactivo utilizado para bloquear la citocinesis en la división de las células permitiendo que las células de una sola división se identifiquen como células binucleadas.

NOTA 1 Las células binucleadas son las células en las cuales se recuentan específicamente los micronúcleos.

2.12 dicéntrico:

Cromosoma aberrante que tiene dos centrómeros derivados de la unión de dos partes de dos cromosomas rotos, generalmente acompañado por un fragmento acéntrico.

2.13 hibridación fluorescente *in situ*, HFIS(FISH):

Técnica que utiliza secuencias específicas del ADN como sondas de partes particulares del genoma, permitiendo que las regiones del cromosoma se resalten o "pinten" de diferentes colores por fijación de varios fluorocromos.

NOTA 1 Esta técnica permite la detección del daño que implica el intercambio entre partes del ADN (generalmente los cromosomas completos) pintadas de forma diferente.

2.14 interfase:

Período del ciclo de la célula entre divisiones mitóticas.

2.15 transferencia lineal de energía, LET:

Cociente dE/dl, como se define por la Comisión Internacional de Unidades y Medidas Radiológicas (ICRU), donde dE es la energía promedio impartida localmente al medio por una partícula cargada de energía específica al recorrer una distancia de dl.

2.16 metafase:

Segunda etapa de la mitosis cuando la membrana nuclear se disuelve, las cromátidas se condensan a sus longitudes mínimas y se alinean para división en la placa de la metafase.

2.17 micronúcleo o micronúcleos, MN:

Pequeño núcleo que surge de los fragmentos atrasados del cromosoma acéntrico o de los cromosomas completos durante la división nuclear y la segregación de los cromosomas en la mitosis durante la anafase/telofase.

NOTA 1 Más del 90% de los micronúcleos inducidos por radiación ionizante surgen a partir de fragmentos atrasados del cromosoma acéntrico.

2.18 nivel de detección mínimo, MDL:

Cantidad medible más pequeña (por ejemplo, frecuencia o dosis) que se detecta con una probabilidad β de no detección (error Tipo II) mientras que se acepta la probabilidad α de decidir erróneamente que una cantidad positiva (no cero) está presente dentro de una muestra de fondo apropiada (error Tipo I).

2.19 dosis mínima detectable:

Menor dosis adicional para que el límite inferior de confianza de Poisson del 95% sea mayor que 0, de forma que exista una posibilidad del 97,5% de que la dosis recibida en exceso del fondo normal sea mayor que 0.

2.20 índice de división nuclear:

Índice en el ensayo CBMN que se calcula a partir de las frecuencias relativas de las células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas.

NOTA 1 Este índice proporciona una medida de la inhibición de la división nuclear.

2.21 precisión:

Dispersión de las mediciones con respecto a un valor medio o tendencia central.

2.22 garantía de la calidad:

Acciones planificadas y sistemáticas necesarias para proporcionar confianza adecuada sobre que un proceso, medición y servicio ha cumplido los requisitos dados para la calidad.

EJEMPLO Dosis especificada en la práctica de un laboratorio de análisis clínico.

2.23 control de calidad:

Parte de la garantía de la calidad destinada a verificar que los sistemas y componentes corresponden con los requisitos predeterminados.

3 Metodología del ensayo del micronúcleo utilizada en esta norma

3.1 Generalidades

En esta norma internacional, se utiliza la frecuencia de micronúcleos en linfocitos binucleados con bloqueo de la citocinesis en los linfocitos de la sangre periférica humana cultivada recontados por microscopia para la estimación de la dosis después de que se sospeche exposición a radiación ionizante.

Los linfocitos se cultivan por un método que permite a las células con bloqueo de la citocinesis divididas una vez ser reconocidas por su aspecto binucleado para análisis. Esto requiere que toda la sangre o los linfocitos se separen de los demás componentes de la sangre para ser incubados en medio de cultivo con un mitógeno que permitiría el recuento de los micronúcleos en células binucleadas de primera generación. Un agente de bloqueo de la citocinesis, la citocalasina-B, se añade por lo menos 6 h antes de que comience la primera mitosis para detener la división de los linfocitos en la etapa de célula binucleada después de que se complete la división nuclear. La duración del cultivo de célula y el momento de la adición de la detención se optimizan para garantizar una adecuada frecuencia de células binucleadas.

Las células binucleadas se recuperan de los cultivos por centrifugación, colocándolas en una solución salina hipotónica y fijándolas en una mezcla de metanol y ácido acético. Las células fijas se colocan sobre los portaobjetos del microscopio y se tiñen. En el caso de los linfocitos aislados, también es aceptable preparar portaobjetos por citocentrifugación de células sobre los portaobjetos, seguido por secado al aire, fijación con metanol y tinción. El laboratorio CBMN debería documentar formalmente el protocolo exacto para el cultivo de las células, la recogida de las células binucleadas y la tinción empleada.

Los portaobjetos del microscopio que contienen las células teñidas se analizan metódicamente para identificar las células binucleadas adecuadas. La frecuencia de micronúcleos observada en un número adecuado de células binucleadas recontadas se convierte en una estimación de la dosis de radiación por referencia a los datos de calibración.

3.2 Requisitos generales del laboratorio

El laboratorio debería estar bien equipado con las unidades requeridas para el peligro biológico, el cultivo de tejidos y el equipo normal de laboratorio para cultivo en tejidos de linfocitos, para la separación celular, para la preparación del portaobjetos y para recuento en microscopio de las células y las estructuras subcelulares, tales como los micronúcleos. El laboratorio debería mantener documentos de la garantía de la calidad incluyendo los que describen la calibración periódica de los equipos utilizados para el cultivo de células como las cabinas extractora de flujo laminar, pipetas, incubadora, etc.

3.3 Solicitudes para el análisis y la toma de muestras de sangre

Dependiendo de la legislación nacional, la solicitud de un análisis debería normalmente hacerse por un médico que represente al paciente, por el paciente mismo, o podría solicitarse debido a demandas legales. En todos los casos donde sea normalmente posible, la extracción de sangre para el análisis de micronúcleos debe efectuarse con el consentimiento informado del paciente. Es recomendable que el jefe del laboratorio mantenga el registro del consentimiento informado del paciente y el paciente debería indicar también a quienes permitirán recibir los datos. Para los menores de edad, debería obtenerse el consentimiento informado de los padres/tutores.

Es responsabilidad del personal médico (por ejemplo doctor, enfermera, etc.) programar la extracción de sangre y transportarla de modo que se garantice que la muestra de sangre es recibida por el laboratorio en las mejores condiciones posibles. El propósito es evitar que la muestra de sangre repose durante varias horas desde el momento de la extracción de la sangre y antes de su recogida para el transporte.

Se recoge la muestra de sangre utilizando anticoagulante heparina de litio o de sodio, se mantiene a temperatura ambiente (a aproximadamente 20 °C) y se cultiva lo más pronto posible, pero antes de 72 h. En algunas circunstancias inevitables que impliquen un retraso más allá de las 72 h, todavía es posible una buena preparación si las muestras de sangre se almacenan con las debidas precauciones, como el uso de paquetes de gel a temperatura ambiente para mantenerlas a una temperatura de 20 °C.

3.4 Cultivo de células

Cada laboratorio CBMN debe establecer y documentar el protocolo para el ensayo CBMN. El protocolo utilizado para la curva de calibración y para las estimaciones de la dosis de muestras de pacientes debe ser idéntico. Hay varios aspectos críticos que deben ser obedecidos.

- a) La sangre utilizada para establecer las curvas de calibración debe incubarse durante 2 h a 37 °C inmediatamente después de la irradiación y antes del cultivo de las muestras.
- b) Los cultivos deberían crearse por duplicado para permitir la determinación del coeficiente de variación intraexperimental.
- c) Las células deben cultivarse a 37 °C ± 0,5 °C bien como sangre total, suspensión enriquecida de linfocitos (capa leucocitaria) o linfocitos aislados.
- d) El contenedor del cultivo debe ser estéril y debe manipularse de forma que se evite la contaminación microbiana.
- e) Deben utilizarse medios de cultivo específicos que permitan que los linfocitos de la sangre periférica humana proliferen.

EJEMPLO Normalmente se utiliza RPMI-1640, Ham's F10, MEM o McCoy suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB (FBS)) entre el 10% y el 20%, 200 mM de L-glutamina y penicilina/estreptomicina (100 UI·ml⁻¹/100 µg·ml⁻¹).

- f) Debe añadirse mitógeno [por ejemplo, la fitohemaglutinina (PHA)] al medio para estimular la mitosis de los linfocitos.
- g) Debe añadirse citocalasina-B (Cyto-B), 24 h a 44 h después de la estimulación mitógena en una concentración de al menos 3,0 µg/ml y no más de 6,0 µg/ml al cultivo de células para bloquear la citocinesis en las células durante su primera división nuclear después de la estimulación mitógena.
- h) El momento de la recogida es crucial para maximizar el número de células binucleadas y para minimizar el número de células multinucleadas y mononucleadas. Debe adaptarse según las condiciones normales de cultivo para cada laboratorio CBMN. El tiempo del cultivo recomendado después de la estimulación mitógena para la recogida de células es de 72 h, pero podría necesitarse más tiempo bajo ciertas condiciones (por ejemplo, donde se prevé el retraso mitótico). Típicamente, las células binucleadas se recogen de 24 h a 48 h después de la adición de la citocalasina B.
- i) Las células pueden tratarse con una solución hipotónica como 0,075 M KCl durante 10 min a 15 min para hinchar las células antes de su fijación.
- j) Las células pueden fijarse en suspensión y transferirse a continuación a los portaobjetos o, alternativamente, pueden transferirse a los portaobjetos por cito-centrifugación y a continuación fijarse en el portaobjeto después de secado al aire. En el caso anterior, las células deben fijarse en solución fijadora recién preparada (es decir, 5:1 de metanol:ácido acético) mientras se agitan las células para evitar la formación de grumos, y se lavan tres o cuatro veces con el mismo fijador hasta que la suspensión de células sea clara. En este último caso, las células deben fijarse en metanol absoluto.
- k) Si se requiere el almacenamiento de las células fijadas, entonces las suspensiones de células deben mantenerse en un congelador a -20 °C.

- l) Deben prepararse los portaobjetos para garantizar la integridad de la membrana celular y permitir una identificación inequívoca de los micronúcleos en las células binucleadas. Las condiciones de humedad y temperatura pueden ajustarse para aumentar la calidad de la dispersión.
- m) deberían realizarse cultivos duplicados de cada muestra de sangre por individuo.

3.5 Tinción

Las células deben teñirse adecuadamente de forma que puedan visualizarse claramente los núcleos y los micronúcleos. Las tinciones utilizadas habitualmente incluyen, pero no están limitadas a, Giemsa (para microscopía sobre fondo claro), DAPI y naranja de acridina (para microscopía de fluorescencia). La tinción utilizada debe ser específica para los núcleos y los micronúcleos para evitar la tinción artefactual de otras estructuras celulares que podrían parecerse a micronúcleos (por ejemplo, centriolos).

3.6 Microscopia

Se utiliza un microscopio de fluorescencia o sobre fondo claro dependiendo de la tinción utilizada. Se requiere la observación de las células a un aumento de al menos 400 × para el recuento de las células y de los micronúcleos. Para el recuento óptimo, sin embargo, se recomienda un aumento mayor (por ejemplo 1 000 ×).

3.7 Recuento visual de los portaobjetos

3.7.1 Generalidades

Cada muestra debe observarse por dos individuos, cada uno contando por lo menos 500 células binucleadas (para un total de al menos 1 000 células binucleadas) de diferentes portaobjetos en busca de presencia de micronúcleos. Las células binucleadas más pequeñas pueden recontarse para muestras de dosis alta o en el modo de clasificación según prioridad (véase el capítulo 10). También debería registrarse la distribución de micronúcleos entre las células binucleadas. Los operadores deberían ser experimentados en el recuento de micronúcleos en linfocitos (véase el capítulo 9).

3.7.2 Criterios para el recuento

3.7.2.1 Criterios para la selección de las células binucleadas que pueden recontarse para la frecuencia de micronúcleos

Las células con bloqueo de la citocinesis que pueden recontarse para la frecuencia de MN deberían tener las siguientes características:

- a) las células deben ser binucleadas (BN);
- b) los dos núcleos en una célula BN deben tener las membranas nucleares intactas y deben encontrarse dentro del mismo límite citoplasmático;
- c) los dos núcleos en una célula BN deben ser aproximadamente iguales en tamaño, en patrón de tinción y en intensidad de tinción;
- d) los dos núcleos en una célula BN pueden estar separados o pueden estar conectados por uno o más puentes nucleoplasmáticos finos, que no son más anchos que 1/4 del diámetro nuclear;

- e) los dos núcleos principales en una célula BN puede tocarse, pero idealmente no deberían solaparse entre sí. Una célula con dos núcleos solapados puede recontarse sólo si los límites nucleares de cada núcleo son distinguibles;
- f) el límite citoplasmático o la membrana de una célula BN debe estar intacto y debe ser claramente distinguible de los límites citoplasmáticos de las células adyacentes.

3.7.2.2 Criterios para el recuento de micronúcleos

Los MN son morfológicamente idénticos a, pero menores que, los núcleos principales. También tendrán las siguientes características:

- a) el diámetro de los MN en los linfocitos humanos debe estar entre $1/16$ y $1/3$ del diámetro medio de los núcleos principales, que corresponde a $1/256$ y $1/9$ del área de uno de los núcleos principales en una célula BN, respectivamente;
- b) los MN no deben estar unidos o conectados a los núcleos principales;
- c) los MN pueden tocarse, pero no solaparse con los núcleos principales, y el límite micronuclear debe distinguirse del límite nuclear;
- d) los MN suelen tener la misma intensidad de tinción que los núcleos principales, pero, en ocasiones, la tinción puede ser menos intensa;
- e) los MN no son refractantes y por lo tanto puede distinguirse fácilmente de los artefactos tales como las partículas teñidas;
- f) no deben recontarse los micronúcleos por encima o por debajo de los núcleos hija.

3.7.2.3 Criterios para la aceptación del recuento

- a) la variabilidad entre los distintos operadores es una de las principales fuentes de variación en el ensayo de micronúcleos. Por lo tanto, es esencial que se mantengan los mismos operadores a lo largo de una evaluación e idealmente, se utilicen dos operadores, cada uno proporcionando un recuento de cada uno de los cultivos duplicados, y se calculen sus valores promedio para tener en cuenta tanto la variación experimental como la del operador. Sin embargo, también es aceptable utilizar un solo operador si no se dispone de dos operadores experimentados.
- b) para las muestras duplicadas en las que se recuenten más de 100 MN por 1 000 células BN, el coeficiente de variación debería ser menor del 20%.

3.7.3 Hojas de datos de recuento

En el anexo A se proporciona un ejemplo de una hoja de datos de recuento.

3.8 Análisis automático

Se han desarrollado varios sistemas para el análisis de imágenes automático para el ensayo CBMN. La automatización en la actualidad está fuera del alcance de esta norma internacional. En el anexo B se describen los esfuerzos en esta área.

4 Confidencialidad de la información personal

4.1 Resumen

Las investigaciones sobre la dosimetría biológica realizadas por un laboratorio CBMN deben llevarse a cabo conforme con las reglamentaciones nacionales con respecto a la confidencialidad. Normalmente incluiría el mantenimiento de la confidencialidad de la identidad, de los datos médicos y del estatus social del paciente. Además, debería respetarse la confidencialidad comercial del empleador del paciente y de cualquier otra organización involucrada en un accidente/incidente radiológico. Este requisito se extiende a lo siguiente:

- a) las comunicaciones escritas, electrónicas o verbales entre el laboratorio y la persona/organización que solicita el análisis y que recibe el informe;
- b) la protección segura de la información confidencial mantenida dentro de la organización donde se encuentra el laboratorio CBMN.

4.2 Aplicaciones del principio de confidencialidad

4.2.1 Delegación de responsabilidades dentro del laboratorio

El responsable del laboratorio puede autorizar un número limitado de personal de laboratorio para tratar con los documentos relacionados con el análisis. Las personas con esta autoridad deben haber firmado un compromiso de confidencialidad con respecto a sus funciones dentro del laboratorio.

El jefe del laboratorio debe mantener los acuerdos de confidencialidad firmados y garantizar la seguridad y la protección de todos los documentos confidenciales.

4.2.2 Solicitudes de análisis

Dependiendo de la legislación nacional, la solicitud de un análisis debería normalmente hacerse por un médico que represente al paciente o por el paciente mismo (pueden añadirse aquí otros solicitantes, especialmente para redes). En todos los casos donde sea posible habitualmente, la extracción de sangre para el análisis de micronúcleos debe efectuarse con el consentimiento informado del paciente y el paciente debería indicar también quienes pueden recibir los datos. Para los menores de edad, debe obtenerse el consentimiento informado de los padres/tutores. El jefe del laboratorio, dependiendo de los reglamentos nacionales, podría estar obligado a mantener un registro del consentimiento informado del paciente.

4.2.3 Transmisión de la información confidencial

Cualquiera que sea el medio de comunicación elegido, debe garantizarse la confidencialidad durante el intercambio de información y de los informes entre el laboratorio CBMN y el solicitante del análisis.

El jefe del laboratorio tiene que definir todos los procesos para la transmisión de la información y para garantizar la confidencialidad.

4.2.4 Anonimato de las muestras

El jefe del laboratorio necesita tener establecidos los protocolos para mantener el anonimato de las muestras. Para evitar la identificación del paciente garantizando la trazabilidad de los análisis, las muestras de sangre deberían codificarse a su llegada al laboratorio CBMN. La codificación se realiza de una manera inequívoca según un procedimiento normalizado. Debe utilizarse el mismo código para todas las etapas del análisis. El código es asignado por una persona autorizada, según se define en el apartado 8.2. La descodificación, la interpretación de los resultados y la compilación del informe también tienen que realizarse por una persona autorizada.

4.2.5 Informe de los resultados

El informe final que contiene los resultados y su interpretación (cuando sea necesario) se comunica al solicitante del análisis. Dependiendo de la legislación nacional, puede pasarse una copia adicional a otra persona responsable, con la correspondiente aprobación.

4.2.6 Almacenamiento

El laboratorio debe almacenar las masas de células cultivadas y los portaobjetos para facilitar la revisión/análisis por parte de un experto u otro laboratorio externo en caso de cualquier disputa en relación con el análisis.

El jefe del laboratorio debe definir cómo se almacenan los datos y los resultados. Todos los documentos del laboratorio relativos a un caso y que pudieran permitir identificar al paciente y/o al empleado deben almacenarse en un lugar sólo accesible a las personas autorizadas. Los documentos deben mantenerse en un lugar adecuado durante al menos 30 años para una posible reevaluación médica/legal del caso. La eliminación final de los registros debe hacerse por medios seguros, como la destrucción de los registros de papel y la completa eliminación de los registros electrónicos.

5 Requisitos de seguridad del laboratorio

5.1 Resumen

El personal debe cumplir con la legislación nacional y las reglamentaciones institucionales en materia de seguridad en los laboratorios. Hay algunas particularidades relativas a la seguridad en los laboratorios de análisis clínicos que vale la pena destacar. Éstas incluyen consideraciones microbiológicas, químicas y ópticas.

5.2 Requisitos de seguridad microbiológica

La manipulación de la sangre humana plantea algún riesgo sobre la transmisión al personal de laboratorio de parásitos e infecciones portados de la sangre. Todas las muestras deberían considerarse como potencialmente infecciosas, aunque se sepa que proceden de personas aparentemente sanas. Las muestras deben desempaquetarse y manipularse en una cabina de seguridad microbiológica de clase 2. Crear los cultivos en dicha cabina tiene la ventaja añadida de minimizar el fallo en el cultivo debido a contaminación microbiana. El uso de agujas hipodérmicas debería mantenerse al mínimo para reducir el riesgo de lesiones. Deben estar disponibles desinfectantes adecuados para hacer frente a derrames. Todos los residuos biológicos y todos los artículos de plástico desechables utilizados deben esterilizarse (por ejemplo, mediante autoclave o incineración, antes de su eliminación final).

Debería ofrecerse al personal la vacunación disponible frente a las enfermedades portadas por la sangre. La posición legal y ética con respecto al ensayo del VIH de muestras de sangre bajo petición difiere entre los países, y los investigadores deberían cumplir sus requisitos nacionales. Debería señalarse que cuando se aceptan muestras de sangre del extranjero, dependiendo del país de origen, las compañías aéreas podrían requerir que el remitente proporcione un certificado confirmando que las muestras han sido ensayadas y que son VIH negativas.

5.3 Requisitos de seguridad química

Ciertos compuestos químicos y farmacéuticos se utilizan de forma rutinaria en los procedimientos cubiertos por esta norma internacional. Cuando están presentes en los cultivos o se utilizan en los procedimientos de tinción, éstos se utilizan principalmente en pequeños volúmenes y en diluciones que normalmente no presentan riesgo para la salud. Sin embargo, se preparan y se almacenan en soluciones madre concentradas. A continuación se enumeran los reactivos principales de interés y sus indicaciones de peligro aceptadas internacionalmente (indicaciones-H) de acuerdo con el sistema de clasificación GHS.

Naranja de acridina	H315, H319, H335, H340
Bencilpenicilina	H317
Bromodesoxiuridina	H351
Colcemida	H300, H310, H330, H340
Citocalasina-B	H300, H310, H330, H340, H361
DAPI	H302, H340, H350
Ácido acético glacial	H226, H314
Tinción Giemsa	H225, H301, H311, H331, H370
Heparina	H303
Tinción Hoechst (Bisbenzimidazoles)	H302, H315, H319
Metanol	H225, H301, H311, H331, H370
Paraformaldehído	H228, H302, H315, H317, H318
Fitohemaglutinina	H303
Sulfato de estreptomina	H302, H 332, H317, H334, H361

Leyendas

H225:	Líquido y vapores muy inflamables
H226:	Líquido y vapores inflamables
H228:	Sólido inflamable
H300:	Mortal en caso de ingestión
H301:	Tóxico en caso de ingestión
H302:	Nocivo en caso de ingestión

- H303: Puede ser nocivo en caso de ingestión
- H310: Mortal en contacto con la piel
- H311: Tóxico en contacto con la piel
- H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves
- H315: Provoca irritación cutánea
- H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel
- H318: Provoca lesiones oculares graves
- H319: Provoca irritación ocular grave
- H330: Mortal en caso de inhalación
- H331: Tóxico en caso de inhalación
- H332: Nocivo en caso de inhalación
- H334: Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación
- H335: Puede irritar las vías respiratorias
- H340: Puede provocar defectos genéticos
- H351: Se sospecha que provoca cáncer
- H361: Se sospecha que perjudica la fertilidad o daña el feto
- H370: Provoca daños en los órganos

5.4 Requisitos de seguridad óptica

Cuando se utilizan lámparas ultravioleta en la esterilización del interior de las cabinas de seguridad microbiológica, deben ponerse en práctica las protecciones y procedimientos de trabajo para evitar la irradiación directa de la piel o de los ojos del personal de laboratorio.

5.5 Plan de seguridad

El jefe del laboratorio debe definir por escrito los procedimientos de seguridad para la protección frente a los riesgos microbiológicos, químicos y ópticos.

El jefe del laboratorio debe mantener un registro de seguridad de "cuasi accidentes", accidentes, y de los protocolos o procedimientos para evitar la repetición de eventos similares.

6 Fuente(s) de calibración, curva de calibración y dosis mínima detectable

6.1 Fuente(s) de calibración

El laboratorio CBMN debe presentar un informe, revisado y avalado por un técnico cualificado (es decir, radiofísico o el jefe del laboratorio CBMN) que aborde las siguientes cuestiones:

- a) Descripción de toda(s) fuente(s) de radiación utilizada(s) para generar las curvas de calibración *in vitro*;
- EJEMPLO Máquina de rayos-X Philips con una capa hemirreductora (CHR (HVL)) de Cu de 2,1 mm, 250 kVp, una corriente de filamento de 12,5 mA y una distancia fuente a superficie (DFS (SSD)) de 50 cm).
- b) caracterización de la(s) fuente(s) de calibración de radiación utilizada(s) para generar cada curva de calibración *in vitro* y trazabilidad por referencia a una norma nacional/internacional sobre radiación;
- c) descripción del protocolo de dosimetría, del procedimiento para certificar que el método de dosimetría está calibrado frente a un patrón, del método utilizado para medir la uniformidad de la dosis en el dispositivo experimental, y de los procedimientos escritos y de la documentación para verificar las determinaciones de la dosis y de la tasa de dosis para los experimentos individuales;
- d) presentación de un informe resumen de la dosimetría para cada curva dosis-respuesta de la fuente de calibración.

6.2 Curva de calibración

Se requiere una curva de calibración del ensayo CBMN para cada laboratorio que realice la dosimetría biológica utilizando el ensayo CBMN. En general, deben utilizarse las mismas condiciones de cultivo para el establecimiento de la curva de calibración como las utilizadas para el análisis de un caso de que se sospeche sobreexposición. La curva debería producirse a partir de por lo menos seis donantes de diferente edad y género con el mismo número de células binucleadas enumeradas de cada donante. La selección del intervalo de dosis de calibración depende de la calidad de la radiación. En el caso de radiación de baja LET, deben seleccionarse más de siete dosis, distribuidas en partes iguales entre la componente lineal y cuadrática de la curva dosis-respuesta. Las dosis típicas para una curva de calibración de baja LET van de 0 Gy a 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy y 4 Gy. Debe justificarse cualquier desviación substancial de este intervalo de dosis. La inclusión de datos 0 Gy (es decir, de muestras de sangre no expuestas a radiación ionizante) en la curva dosis-respuesta de calibración es importante ya que permite determinar el punto de origen y tener en cuenta el efecto de la edad y del género en las frecuencias del micronúcleo de base.

Para dosis por debajo de 0,5 Gy, deberían recontarse la frecuencia de micronúcleos en al menos 2 000 células binucleadas por dosis para cada donante, y para dosis mayores de 0,5 Gy, deberían recontarse en al menos 1 000 células binucleadas por dosis para cada donante. Las frecuencias observadas de micronúcleos en las células binucleadas deberían ajustarse a los modelos lineales o cuadráticos como se muestra en la fórmula (1). Para la mayoría de los tipos de radiación de alta LET, debería ser más apropiado un modelo lineal.

$$Y = C(\pm SE_C) + \alpha D_T(\pm SE_\alpha) + \beta D_T^2(\pm SE_\beta) \quad (1)$$

donde

Y es la tasa de micronúcleos;

C es el fondo de la población;

α y β son los coeficientes de la ecuación;

D_T es la dosis absorbida en el tejido en Gy;

SE es el error tipo de la media para cada coeficiente y constante.

Para el ajuste de las curvas debería utilizarse el método de mínimos cuadrados con ponderación iterativa. Para datos demasiado dispersos, las ponderaciones deben tener en cuenta la sobredispersión. Cuando el valor obtenido de chi-cuadrado es superior a los grados de libertad, deberían aumentarse los errores tipo mediante (chi al cuadrado/grado de libertad) $1/2$. Para calcular el error tipo de la curva, deberían combinarse los errores tipo procedentes de los donantes, teniendo en cuenta la posible sobre dispersión a partir de la distribución de Poisson.

El laboratorio CBMN debe proporcionar un informe sobre la fuente de calibración, el intervalo de la dosis y la curva dosis-respuesta, y debe estar revisado y avalado por un técnico cualificado (es decir, radiofísico de laboratorio CBMN o equivalente) que aborde las siguientes cuestiones:

- a) descripción de la disposición experimental de exposición (soporte de la muestra, control de temperatura, etc.) y de los procedimientos para verificar la reproducibilidad de la disposición de exposición para los experimentos individuales;
- b) detalles de los datos de calibración *in vitro* y su ajuste a una curva de calibración.

6.3 Frecuencia de fondo de los micronúcleos

Ha sido bien establecido que la frecuencia de fondo de micronúcleos en los individuos varía con la edad y género y también debido a diversos factores desconcertantes (es decir, estado nutricional, exposiciones genotóxicas, factores sobre el estilo de vida, la mala segregación de los cromosomas sexuales). Para fines de dosimetría biológica de la radiación utilizando la frecuencia de MN en los linfocitos, se asume que el valor de la frecuencia de MN de base de un individuo antes del evento de exposición a radiación ionizante es equivalente al valor medio de la frecuencia de MN de las células no irradiadas para su grupo de edad y género. Idealmente, la frecuencia de fondo de micronúcleos incluiría los resultados para al menos tres grupos de edad separados en, de 1 año a 25 años, de 26 años a 50 años, de 51 años a 75 años, e incluiría al menos tres hombres y tres mujeres en cada grupo para incluir valores base para ambos géneros en los distintos grupos de edad. El laboratorio debería generar su propia base de datos de las frecuencias de micronúcleos de base. Debe restarse el valor medio de los MN para la correspondiente edad y género a partir de la frecuencia de MN en linfocitos observada después del evento de exposición a la radiación para deducir el valor de la frecuencia de MN probablemente inducido. Este último valor se utiliza a continuación para estimar la dosis de exposición a partir de la radiación de la curva patrón para los MN inducidos por radiación.

6.4 Medición de la dosis mínima detectable

La dosis mínima detectable es una función de los niveles de fondo de micronúcleos medidos por el laboratorio, de los coeficientes de la curva de calibración y del número de células recontadas en un análisis y se limita a la dosis más baja utilizada en la curva de calibración apropiada. El nivel de detección mínimo puede ser tan bajo como 0,18 Gy y tan alto como 0,26 Gy, dependiendo de la edad y del género.

El laboratorio CBMN debe proporcionar un informe revisado y avalado por un técnico cualificado (es decir, radiofísico de laboratorio CBMN o equivalente) que describa tasa de micronúcleos determinada por el laboratorio para los controles de referencia y los niveles de radiación inducida medidos para su medición de la dosis mínima detectable propuesta y del número de células recontadas por muestra.

7 Responsabilidad del cliente

Este capítulo incluye los elementos que no están controlados por el laboratorio CBMN. Antes de la extracción de sangre, debe producirse la coordinación entre el cliente y el laboratorio CBMN. Debería explicarse al cliente los requisitos esenciales y esto puede hacerse mediante una hoja de instrucciones normalizadas como se ilustra en el anexo C. Las características esenciales son las siguientes:

- a) la extracción de sangre debería utilizar el sistema de recolección, conteniendo heparina de litio o de sodio como anticoagulante, que haya sido enviado o especificado por el laboratorio CBMN;
- b) la sangre debe extraerse (al menos 5 ml), etiquetarse de forma exacta y sin ambigüedades, debe mantenerse a aproximadamente 20 °C (18 °C a 22 °C) y debe llegar al laboratorio CBMN tan pronto como sea posible dentro de las 72 h posteriores a la extracción;
- c) deben tomarse precauciones para garantizar la integridad del contenedor y prevenir fugas durante el transporte. El envasado y el etiquetado debe cumplir con las reglamentaciones nacionales e internacionales y si se trata de transporte aéreo, debería incluirse un dosímetro físico para controlar si la muestra ha estado expuesta a radiaciones ionizantes en el tránsito. Las muestras de sangre deben mantenerse refrigeradas durante el transporte con un intervalo de temperatura recomendada de 6 °C a 22 °C. Debería incluirse un dispositivo de registro de la temperatura (registrando la temperatura más baja y la temperatura más alta) para documentar que la temperatura durante el transporte fue controlada adecuadamente;
- d) debe completarse el cuestionario proporcionado por el laboratorio CBMN y debe devolverse con rapidez, preferiblemente junto con la muestra de sangre;
- e) debe alertarse al laboratorio CBMN acerca de muestras infecciosas conocidas (VIH o hepatitis, especialmente).

8 Responsabilidad del laboratorio CBMN

8.1 Implantación y mantenimiento del programa de garantía de calidad

El laboratorio CBMN debe establecer y mantener un programa de garantía de calidad (véase el capítulo 11), que cubra todos los aspectos del servicio. El programa de garantía de calidad debe incluir lo siguiente:

- a) comprobaciones internas periódicas del funcionamiento de los equipos, de la adecuación de los reactivos y distintas comprobaciones del comportamiento (es decir, ejercicios de intracomparación, cualificaciones del operador, protocolo de muestra, del recuento, estimaciones de la dosis, generación de informes, etc.);
- b) comprobaciones externas periódicas del funcionamiento del laboratorio. Las auditorías externas deben incluir una revisión de la documentación del laboratorio CBMN del funcionamiento de los equipos, de la adecuación de los reactivos y distintas comprobaciones del comportamiento (es decir, ejercicios de intracomparación, cualificaciones del operador, integridad del transporte de la muestra, etc.).

8.2 Responsabilidad durante el servicio

El laboratorio CBMN debe prestar el asesoramiento, los procedimientos e informes necesarios para proporcionar la evaluación de la dosis mediante el ensayo CBMN con una solicitud de servicio. Las actividades de servicio deben abordar los siguientes temas:

- a) el laboratorio CBMN debe tener documentación, revisada y avalada por un técnico cualificado (es decir, radiobiólogo del laboratorio CBMN o equivalente), que incluya lo siguiente:
 - 1) una hoja de instrucciones para enviar al cliente describiendo los procedimientos de envío (véase el anexo C);
 - 2) un cuestionario que debe obtener el consentimiento del paciente y obtener información sobre la exposición corporal total o parcial, la fuente y la calidad de la radiación, las circunstancias de la exposición, lugar de la exposición (país, ciudad, empresa, etc.), fecha y hora de la exposición, exposición ocupacional o médica a radiaciones anterior, ingesta de fármacos, infección, hábito de fumar y la exposiciones significativas a cualquier otro agente que dañe el ADN, tales como disolventes orgánicos o metales pesados (véase el anexo D);
 - 3) los procedimientos paso a paso para el procesamiento de la muestra de sangre desde la recepción de la muestra hasta el registro de la dosis;
- b) en respuesta a una solicitud de servicio, debe enviarse al cliente un dispositivo de recolección de sangre (por ejemplo, tubo estéril de 10 ml) que contenga heparina de litio o de sodio como anticoagulante, incluyendo el material de embalaje etiquetado debidamente y con la dirección adecuada para el retorno de la muestra al laboratorio CBMN. El embalaje debe cumplir con las reglamentaciones nacionales y/o internacionales para el tránsito de muestras patológicas potencialmente infecciosas (véase 11.3.3);
- c) deben realizarse los siguientes pasos después de la recepción de la muestra de sangre:
 - 1) se documenta la recepción de la muestra de sangre (fecha, hora, destinatario);
 - 2) se codifica la muestra de sangre;
 - 3) se documenta el lugar y la duración y temperatura de almacenamiento hasta la creación de los cultivos;
 - 4) se crean cultivos duplicados en paralelo tan pronto como sea posible y se documenta la fecha, hora, y el operador;
 - 5) se documenta con números de lote según corresponda todos los reactivos utilizados para el cultivo;
 - 6) se documenta la adición de reactivos y el final del cultivo (fecha, hora, operador);
 - 7) se documenta el almacenamiento a corto y a largo plazo de la muestra hasta la preparación del portaobjeto;
 - 8) se documentan los códigos del portaobjeto, el número de portaobjetos y la ubicación del almacenamiento;

- 9) se documentan los resultados del recuento y del análisis;
- 10) se almacenan los portaobjetos y los documentos del caso en un lugar adecuado durante al menos 30 años para una posible reevaluación médica/legal del caso;
- d) el laboratorio CBMN debe interpretar los resultados y debe elaborar los informes (véase el anexo E);
- e) el laboratorio CBMN debería mantener un diálogo con el solicitante, volviendo a priorizar los casos como sea necesario, y proporcionando los resultados al solicitante.

9 Sobreexposición accidental de pocos individuos

9.1 Procedimiento para el recuento de micronúcleos en células binucleadas

9.1.1 Codificación de las muestras y portaobjetos

Deben codificarse todas las muestras, portaobjetos y los patrones de validación intralaboratorio o interlaboratorio. Deben mantenerse los registros completos de la codificación.

9.1.2 Técnicas de recuento

El jefe del laboratorio debe establecer e implementar procedimientos para las técnicas de recuento utilizadas. Cuando el recuento se realiza por lo menos parcialmente con análisis de imagen asistida por ordenador, el sistema utilizado debería haber sido previamente sometido a ensayos de garantía de la calidad con resultados documentados.

La exploración metódica de los portaobjetos es crucial para garantizar el análisis completo sin recontar más de una vez cualquier célula.

Deberían seguirse los criterios para el recuento de acuerdo con el apartado 3.7.

9.1.3 Competencia del laboratorio para el recuento

El jefe del laboratorio es responsable de asegurar que los operadores están formados apropiadamente para recontar los portaobjetos según esta norma. Todos los operadores deben participar en las comparaciones intralaboratorio e interlaboratorio. Un conjunto de portaobjetos de calibración con frecuencias de micronúcleos conocidas (por ejemplo, los portaobjetos para generar una curva de calibración) deberían utilizarse rutinariamente para verificar que la exactitud de recuento del operador está bien, dentro del intervalo de recuento esperado. Los operadores deben ser capaces de lograr coeficientes de variación aceptables (no mayores que el 40%) para los recuentos repetidos de los portaobjetos de control patrón y deben ser capaces de que los valores absolutos estén dentro de los límites de confianza de Poisson del 95% de la tasa de referencia del ensayo a partir de la curva de calibración del laboratorio.

9.2 Criterios para la conversión de una tasa de micronúcleos en una estimación de la dosis absorbida

9.2.1 Resumen

La frecuencia de micronúcleos medida se convierte en dosis absorbida por referencia a una curva de calibración apropiada *in vitro* producida en el mismo laboratorio con radiación de calidad comparable en cuanto a la tasa de dosis y a la transferencia lineal de energía. Esto proporciona una estimación de la dosis media a todo el cuerpo. En los casos convencionales, deberían recontarse al menos 1 000 células binucleadas para cada caso, a menos que la tasa de micronúcleos sea alta (por ejemplo > 1 micronúcleo por célula), en cuyo caso, no es necesario proceder más allá de recontar suficientes células binucleadas para observar 500 micronúcleos. En el caso especial donde existe una alta abundancia de micronúcleos pero pocas células binucleadas, puede indicarse la dosis después de observar 250 micronúcleos.

9.2.2 Comparación con controles

El laboratorio CBMN debe proporcionar en los informes del caso la frecuencia de fondo de micronúcleos del laboratorio. Si la frecuencia de micronúcleos medida no es significativamente diferente de la frecuencia de fondo, la mejor estimación de la dosis debería darse como cero con su límite superior de confianza. Si la frecuencia de micronúcleos medida es significativamente más alta que el nivel de fondo, entonces debe calcularse y registrarse una estimación de la dosis con su incertidumbre (véanse 6.3 y 6.4).

Un enfoque alternativo es restar el valor de fondo promedio de micronúcleos para la categoría de edad y de género apropiada del individuo bajo ensayo, y utilizar este valor corregido para calcular la dosis de exposición a partir de la curva de calibración de la dosis de radiación-respuesta de la frecuencia de los MN inducidos en las células binucleadas. Si se utiliza este enfoque para crear la curva de calibración, esto debe especificarse y explicarse en los registros/informes.

9.2.3 Determinación de la dosis estimada y de los límites de confianza

El laboratorio de ensayo CBMN debe proporcionar en los informes de resultado la dosis de todo el cuerpo y los límites de confianza estimados. Las incertidumbres generalmente se expresarían como límites de confianza del 95% aunque pueden darse otros valores de porcentaje, si se consideran apropiados para un caso particular. Si el límite inferior de confianza cae por debajo de la dosis cero, sólo es necesario darse el límite superior.

El jefe del laboratorio debe definir los métodos utilizados para determinar los límites de confianza.

9.2.4 Casos de exposición aguda y no aguda

Si se conoce que se ha recibido una sobreexposición aguda (es decir, por debajo de 0,5 h), la estimación de la dosis puede obtenerse por referencia a una curva de calibración aguda *in vitro*. Si se sabe que la sobreexposición se ha prolongado más allá de 24 h, la estimación de la dosis puede obtenerse por referencia sólo al nivel de fondo y a los coeficientes lineales de la curva de calibración aguda. Para exposiciones de 0,5 h a 24 h, si está disponible, la tasa medida puede interpretarse a partir de una curva de calibración no aguda adecuada. Alternativamente, puede utilizarse la curva aguda completa, pero con una reducción del coeficiente cuadrático de la dosis. Esto puede calcularse por el método de la función G.

NOTA En los informes técnicos de la IAEA pueden encontrarse explicaciones adicionales de la función G.

Si se conoce que una sobreexposición ha sido intermitente, puede suponerse que sus fracciones individuales son independientes, es decir, sus efectos son aditivos, si el intervalo de interacción es superior a 5 h. Si está por debajo de 5 h, debería estimarse un factor de interacción utilizando una constante de tiempo de 2 h.

El laboratorio de ensayo CBMN debe indicar en los informes del resultado el método utilizado para corregir las estimaciones de la dosis de la exposición no aguda y, cuando sea apropiado, también justificar sus suposiciones.

9.2.5 Análisis de la distribución de micronúcleos por célula binucleada

Debería analizarse el grado de sobredispersión de la distribución de micronúcleos entre las células binucleadas. Esto debería hacerse mediante el ensayo u , que es una unidad normalizada del índice de dispersión $D = s^2/y$ (varianza/media), como se muestra en la fórmula (2). Para una distribución de Poisson D debería ser la unidad, los valores de u mayores que 1,96 indican una sobredispersión (nivel de significancia, $\alpha = 0,025$). El grado de sobredispersión puede dar una indicación de la heterogeneidad de la exposición, sin embargo, el uso de este enfoque para la estimación de la exposición corporal parcial utilizando el ensayo CBMN necesita investigación adicional. Sin embargo, si el laboratorio decide utilizar este enfoque, todas las conclusiones deben ser cuidadosamente documentadas y justificadas.

$$u = (D - 1) \times \sqrt{\frac{N - 1}{2 \times \left(1 - \frac{1}{X}\right)}} \quad (2)$$

donde

N es el número de células binucleadas analizadas;

X es el número de micronúcleos detectados.

9.3 Informe de resultados

9.3.1 Generalidades

Habitualmente, el informe debe contener la frecuencia de micronúcleos por célula binucleada y su interpretación basada en la comprensión actual de los mecanismos de formación de micronúcleos inducida por la radiación. Debe comunicarse la información relevante proporcionada por el cliente (por ejemplo, circunstancias de que se sospeche exposición, medición independiente de la dosis, etc.) ya que esto puede influir en la interpretación de los resultados en el laboratorio de análisis clínicos.

El informe debería subdividirse en las siguientes secciones.

9.3.2 Contenido del informe (véase el anexo E para un formulario normalizado)

El informe debería incluir información sobre los siguientes puntos:

- a) título del informe (es decir, "informe del ensayo");
- b) nombre y dirección del laboratorio que realiza el análisis;

- c) identificación del informe mediante un número único (es decir, un número de documento específico proporcionado por el registro institucional);
- d) nombre y dirección del cliente, fecha de la solicitud;
- e) identificación del método de análisis (es decir, proporcionando el número y el nombre del método como se describe en el sistema de calidad interno y, cuando sea relevante, cualquier desviación del método de ensayo);
- f) identificación inequívoca de la muestra (es decir, nombre, código interno y fecha de nacimiento del sujeto expuesto);
- g) descripción del caso: debe indicarse toda la información proporcionada por el cliente que sea relevante para la interpretación del resultado (puede también tratarse de la interpretación de los resultados);
- h) fecha y lugar de la extracción de sangre, fecha de la llegada de la muestra al laboratorio, fecha de la creación de los cultivos (si es diferente) y fecha de finalización del análisis;
- i) resultados del ensayo: número de células binucleadas recontadas, el número de micronúcleos encontrados, la distribución de micronúcleos entre las células binucleadas;
- j) interpretación de los resultados del ensayo (véase 9.3.3);
- k) nombre(s), título(s), puesto(s) y firma(s) que autoriza(n) el informe y la información de contacto.

9.3.3 Interpretación de los resultados

Esto varía dependiendo de las circunstancias de cada caso, pero el informe debería incluir uno o más de los siguientes puntos:

- a) estimación de la dosis basada en la frecuencia de micronúcleos, expresada en unidades SI de dosis absorbida (Gy);
- b) declaración sobre la posibilidad de que cualquier micronúcleo utilizado en la estimación de la dosis se refiera a este incidente radiológico particular;
- c) la frecuencia de fondo de micronúcleos del laboratorio y los coeficientes de la curva de calibración utilizados para convertir la dosis a partir de la frecuencia de micronúcleos;
- d) cuantificación de las incertidumbres en la estimación de la dosis. Esto normalmente sería un límite de confianza superior y, donde sea apropiado, límite de confianza inferior, y el porcentaje del nivel de confianza;
- e) declaración sobre si la estimación de la dosis fue asumiendo radiación aguda o prolongada y, si es lo último, cómo se tuvo en cuenta la prolongación;
- f) si procede, la interpretación tiene que considerar el retraso entre el accidente y la extracción de sangre;

- g) resumen de los elementos clave esenciales de los puntos anteriores. Esto normalmente incluiría la mejor estimación de la dosis basada en los resultados citogenéticos;
- h) al final del informe: una invitación al cliente para ponerse en contacto con el laboratorio si requiere aclaración o explicación adicional acerca de los resultados y/o el ensayo.

10 Clasificación de la población

10.1 Generalidades

El potencial de emergencias nucleares y radiológicas que implican un gran número de víctimas de actos accidentales o de actos maliciosos del terrorismo requiere procedimientos genéricos para la evaluación de la dosis de emergencia para ayudar al desarrollo de las capacidades de respuesta médica. Un incidente con gran número de víctimas se define aquí como un evento que excede los recursos médicos locales.

El ensayo CBMN en un modo de clasificación según prioridad evalúa aproximada y rápidamente las dosis de radiación recibidas por los individuos con el fin de facilitar la clasificación clínica de las víctimas.

10.2 Utilización de una red de ensayo CBMN para exposiciones a gran escala

Para lidiar con situaciones con un gran número de víctimas, pueden establecerse redes de biodosimetría citogenética que consten de un laboratorio de referencia complementado por laboratorios satélite, ya sea a nivel nacional o internacional. La Norma ISO 21243 aborda la creación de redes citogenéticas para el ensayo dicéntrico. Esta norma internacional puede aplicarse igualmente para el ensayo CBMN.

10.3 Procedimiento para el recuento de micronúcleos en células binucleadas

Debería utilizarse el mismo procedimiento que el descrito en el apartado 9.1 con la modificación como se describe a continuación.

En el modo de clasificación según prioridad, si sólo necesitan identificarse rápidamente individuos expuestos a menos de 1 Gy de radiación y existe un número abrumador de sujetos ensayar, es suficiente el recuento de un mínimo de 200 células binucleadas, a menos que la tasa de micronúcleos sea alta, en cuyo caso, es adecuado recontar suficientes células binucleadas para observar 200 micronúcleos. En el caso especial donde exista una alta abundancia de micronúcleos pero pocas células binucleadas, puede registrarse la dosis después de observar 100 micronúcleos.

10.4 Criterios para la conversión de una tasa de micronúcleos en una estimación de la dosis absorbida

Debería utilizarse el mismo criterio que el descrito en el apartado 9.2 con las siguientes excepciones:

- a) sólo tienen que recontarse un máximo de 200 células binucleadas, a menos que se observen 200 micronúcleos en un menor número de células binucleadas;
- b) debería utilizarse un sólo nivel fondo promedio de micronúcleos como un control como se describe en el primer párrafo del apartado 9.2.2. No se requieren los valores de fondo adaptados a la edad.

10.5 Informe de resultados

El informe debería incluir todo el contenido del apartado 9.3.2 que sea posible. Sin embargo, pueden tabularse múltiples muestras en el mismo informe si es apropiado (véase el anexo F para el informe de múltiples individuos).

11 Garantía de la calidad y control de calidad

11.1 Resumen

Como mínimo, las prácticas de garantía de la calidad y del control de calidad abajo citadas aplican a los laboratorios que realizan la dosimetría biológica mediante el ensayo CBMN.

11.2 Garantía de la calidad

11.2.1 Plan de garantía de la calidad

11.2.2 Persona u organización responsable de la garantía de la calidad

El plan de garantía de la calidad debe designar a una organización o persona, por lo general el jefe del laboratorio, con conocimientos suficientes para identificar los problemas de garantía de la calidad y con suficiente autoridad para iniciar o recomendar las acciones correctivas y para proporcionar la verificación de las correcciones de la deficiencia.

11.3 Control de calidad

11.3.1 Generalidades

Deben realizarse comprobaciones del comportamiento para garantizar la conformidad de los procesos analíticos, de los equipos y procedimientos de medición, y de las instalaciones con respecto a los requisitos de funcionamiento predeterminados.

11.3.2 Procedimientos de control de calidad

El laboratorio debe tener procedimientos de control de calidad escritos para verificar que la calidad de la estimación de las mediciones de la dosis absorbida cumple con los requisitos de exactitud especificados en el capítulo 9. Los procedimientos de control de calidad deberían incluir lo siguiente:

- a) uso de patrones de referencia trazables;
- b) comprobaciones del comportamiento de los sistemas de medición;
- c) calibración del instrumento;
- d) análisis intralaboratorio (por ejemplo, cantidades conocidas, replicados y blancos);
- e) participación en programas disponibles de intercomparación interlaboratorio;
- f) comprobaciones computacionales;

- g) revisión de los procedimientos, las especificaciones y los registros de funcionamiento;
- h) cumplimiento de las operaciones y evaluación de los datos del control de calidad;
- i) evaluación de la conformidad con respecto a los criterios de comportamiento de esta norma internacional;
- j) evaluación de los datos del control de calidad para garantizar la coherencia a largo plazo de los resultados analíticos;
- k) verificación de las determinaciones de nivel de detección mínimo.

11.3.3 Comprobaciones del comportamiento de la integridad del transporte de la muestra

En muchos casos, la extracción de sangre se produce en lugares alejados del laboratorio de procesamiento y es necesario el transporte. Si se utiliza el transporte aéreo, hay que evitar la irradiación con rayos-X en los puestos de control de seguridad. Debería incluirse un dosímetro físico en el paquete de envío para comprobar esto. Para transporte internacional, deben obtenerse previamente los permisos correspondientes y deben incluirse en el envío para evitar retrasos en la aduana. Deberían registrarse todos los datos sobre el almacenamiento y la extracción de sangre. Debido al riesgo de enfermedades infecciosas (hepatitis, VIH), deben seguirse las precauciones necesarias cuando se manipulen las muestras de sangre.

11.3.4 Comprobaciones del comportamiento de la integridad de la muestra por el laboratorio CBMN

Debería establecerse un sistema para el registro de la extracción, el transporte y el almacenamiento de las muestras de sangre para garantizar la integridad de la muestra. El uso de muestras codificadas es fundamental para evitar posibles sesgos en el recuento. Como garantía de la calidad interna, debería incluirse un control negativo seleccionado al azar de un grupo de sujetos sanos no expuestos para probar la fiabilidad del procedimiento. La sangre de los individuos expuestos y no expuestos debe manipularse de la misma forma. Tienen que tomarse las muestras de sangre de ambas poblaciones simultáneamente y no sucesivamente.

11.3.5 Comprobaciones del comportamiento de la instrumentación

Debe comprobarse y evaluarse el comportamiento de los equipos de medición a intervalos regulares mientras el equipo está en uso. Por ejemplo, tiene que controlarse la estabilidad del control de temperatura de las incubadoras. Estas comprobaciones deben ser suficientes para demostrar que el equipo de medición está calibrado de forma correcta y que todos los componentes están funcionando correctamente. Deberían también hacerse periódicamente mediciones replicadas *in vitro*. Deben utilizarse técnicas como gráficos de control de calidad o de tolerancia para la evaluación del comportamiento del instrumento. Debe realizarse una medición del control de calidad antes de la utilización del instrumento, y el número de mediciones de control de calidad debería representar al menos el 5% del número total de mediciones.

11.3.6 Comprobaciones del comportamiento del protocolo de muestra

Deben describirse en detalle los procedimientos de cultivo, de fijación y de tinción en el manual de calidad. En el manual de calidad debe describirse la composición de cada reactivo tan exactamente como sea posible.

Deben analizarse muestras de interés que contengan exposiciones conocidas de dosis y calidad de radiación específica para determinar el sesgo y la precisión de los procedimientos analíticos. Deberían también procesarse periódicamente muestras replicadas. Deben utilizarse técnicas estadísticas como los gráficos de control de calidad para evaluar datos de comportamiento de los procedimientos citogenéticos de dosimetría biológica. El número de muestras del control de calidad debe ser igual a por lo menos el 5% de las muestras totales analizadas.

11.3.7 Comprobaciones del comportamiento del recuento de la muestra

Antes del análisis, deberían almacenarse los portaobjetos microscópicos o suspensiones de células fijadas de manera que mantengan su alta calidad. Deben utilizarse criterios de recuento uniformes. Debe realizarse el recuento por observadores entrenados y experimentados. Si participan diferentes operadores, debe utilizarse un diseño de recuento equilibrado. Cada operador debería analizar el mismo número de células binucleadas de los portaobjetos de todos los sujetos en lugar de que operadores diferentes analicen todas las células de los distintos sujetos. Debe registrarse la identidad del operador de los portaobjetos. Debería incluirse una muestra de garantía de la calidad positiva dentro del conjunto de portaobjetos del estudio. Independientemente de la actividad del servicio, la garantía de la calidad interna implica periódicamente la comparación de los resultados del recuento de las muestras replicadas entre los operadores. Las etapas de la garantía de la calidad externa implican el intercambio de muestras replicadas con otros laboratorios. Además, la garantía de la calidad externo requiere la organización de intercomparaciones multicentro a intervalos de tiempo regulares para garantizar la uniformidad de los resultados del recuento entre los laboratorios.

11.3.8 Comprobaciones del comportamiento de la estimación de la dosis y de los límites de confianza

Deberían utilizar ensayos no paramétricos para el análisis estadístico univariable porque los datos del micronúcleo podrían no distribuirse normalmente. Tienen que calcularse los límites de confianza de la exposición a partir de la incertidumbre de las tasas de micronúcleos y de la variación de la relación dosis-respuesta entre los individuos, por lo general determinada en un estudio previo. La relación dosis-respuesta utilizada para estimar los límites de confianza de la exposición debe seleccionarse apropiadamente dependiendo de si la exposición fue crónica o aguda.

11.3.9 Comprobaciones del comportamiento de la generación del informe de resultado

Debe examinarse cada estudio informado al cliente para asegurarse de que contiene la información necesaria como se define en esta norma internacional (véase el capítulo 10), en concreto: la identificación del sujeto y del cliente, la información sobre la exposición, la fecha de exposición y de extracción, los resultados del recuento, la interpretación de los resultados en términos de dosis y su incertidumbre y la información de cómo esto se calculó.

Anexo A (Informativo)

Hoja de datos de ejemplo para el recuento de los micronúcleos en células binucleadas

Nº de muestra/Código del portaobjeto:

Nº de microscopio:

Operador (Nombre, Apellido):

Fecha (Día/Mes/Año):

Nº del portaobjeto	Distribución de micronúcleos en células BN							Nº total de células BN	Nº total de micronúcleos
	0 MN	1 MN	2 MN	3 MN	4 MN	5 MN	> 5 MN		
1	468	27	4	1	0	0	0	500	38
2	472	26	2	0	0	0	0	500	30
1 + 2	940	53	6	1	0	0	0	1 000	68
Observaciones:									

MN: micronúcleos

BN: binucleada

NOTA Los números en la tabla se dan sólo como ejemplo.

Anexo B (Informativo)

Automatización del recuento de micronúcleos

En los últimos 20 años, ha habido varios intentos de establecer un sistema de recuento automático de MN, pero ninguno de los sistemas fue validado adecuadamente para el uso en diagnóstico rutinario. Mientras tanto, nuevos avances en *hardware* y *software* han hecho que estén disponibles sistemas avanzados, especialmente el rápido progreso en los dispositivos ópticos y las unidades de almacenamiento de datos más grandes permiten nuevos enfoques en el análisis de imagen automático.

La razón para promover la automatización del ensayo de micronúcleos tiene múltiples motivaciones. Un ensayo automático podría reducir las incertidumbres relacionadas con el recuento humano y aumentar la capacidad de procesamiento de muestras. La posibilidad de recontar rápidamente un número alto de muestras sería de interés en todos los proyectos de bio-monitoreo (es decir, grupos expuestos a agentes mutagénicos como sustancias químicas o radiación reactivas para el ADN), en investigación del cáncer y en la terapia de radiación frente al cáncer (es decir, la sensibilidad individual a cada mutágeno y/o a la radiación, como ensayo predictivo para la terapia frente al cáncer individual), y como una herramienta de biodosimetría de preselección en caso de un accidente de radiación a gran escala.

Aunque la automatización de los ensayos de los MN es relevante para diferentes tipos de células (es decir, células bucales, eritrocitos), en este anexo, el foco está en los linfocitos de la sangre periférica humana, el tipo de célula principal utilizado para la dosimetría biológica. El punto de interés se limita aquí al ensayo CBMN, es decir, a la frecuencia de los micronúcleos en las células binucleadas (BN) cultivadas con bloqueo de la citocinesis.

La cuantificación manual de la tasa de micronúcleos en células BN puede requerir mucho tiempo si un gran número de muestras que tienen que analizarse después de la exposición *in vivo*. Además, hay algunos sesgos/variabilidad debido a la interpretación subjetiva de los criterios de recuento. El proceso de automatización del análisis de imagen puede superar esto y puede generar un sistema de alta capacidad de procesamiento con gran reproducibilidad una vez que se establezcan y se acepten para su uso entre laboratorios un conjunto de parámetros de clasificación para reconocer las células binucleadas y los micronúcleos entre ellas. Un requisito muy importante para el uso de máquinas de recuento automático es el conocimiento acerca de las incertidumbres asociadas con los resultados y los posibles factores de confusión.

Una característica importante para recibir datos comparables entre los diferentes laboratorios que utilizan el mismo sistema automático será un protocolo normalizado (optimizado para los requisitos del sistema) para el cultivo de linfocitos, para la preparación del portaobjeto, para la tinción del portaobjeto y para los parámetros de clasificación del análisis de imagen.

Dentro del campo, hay tres sistemas importantes con diferentes tecnologías y procedimientos de fondo.

La citometría de flujo se ha utilizado desde el comienzo de la década de 1990 como un método para cuantificar los micronúcleos. La principal limitación de este método resulta de la necesidad de analizar células lisadas (dando por resultado la destrucción de las membranas plasmáticas) con MN en suspensión. En consecuencia, las estrategias para discriminar entre los desechos celulares, los fragmentos nucleares apoptóticos y los MN no siempre fueron efectivas causando un aumento en el número de positivos falsos de MN. Otra restricción es la pérdida de información sobre la distribución de los MN en la población celular y, además, no se puede almacenar las muestras medidas para fines de documentación. Además, no es posible en un sistema de citometría de flujo convencional restringir el recuento a las células divididas una sólo vez, lo que es esencial para la medición exacta del micronúcleo sin factores de confusión por la cinética de división celular en el cultivo. Sin embargo, un nuevo sistema de citometría de flujo por imagen recientemente desarrollado tiene la capacidad de identificar las células binucleadas con bloqueo de la citocinesis y para detectar parcialmente los micronúcleos dentro de ellas.

Superior a este enfoque son los citómetros de barrido láser (LSC) recientemente desarrollados que proporcionan excitación de fluorescencia con hasta cuatro longitudes de onda láser diferentes. Este método puede analizar las células, fijadas sobre el portaobjetos del microscopio o en placas multipozo. Una tinción diferencial simultánea del ADN (por ejemplo, PI) y las proteínas (por ejemplo, FITC) ofrece una mejor identificación de los MN que la tinción del ADN por sí sola. Los MN se caracterizan por su contenido de DNA y la relación DNA/proteína proporciona un parámetro adicional para distinguir los MN de artefactos. El *software* es capaz de identificar el número de MN de cada célula individual por la detección mediante el protocolo de recuento del área HFIS(FISH) en el *software*, y proporciona información sobre la distribución de los MN entre las células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas. El análisis de imagen reveló que el 93% de los objetos detectados eran MN. Se detectan células binucleadas por su contenido en ADN (índice ADN del 2.2 al 3.8), confirmado como > 80% positivo verdadero, y los MN se recuentan específicamente en tales células. Hay una buena correlación ($r = 0,87$) en las células MCF-7 entre el análisis visual y el LSC.

Otra estrategia es utilizar microscopios computarizados como sistemas avanzados de análisis de imagen. Por ejemplo, un sistema está equipado con un módulo de software que analiza las muestras del ensayo CBMN de forma completamente automática en busca de micronúcleos utilizando un objetivo de microscopio $\times 10$. La detección automática de células mono-nucleadas y células binucleadas proporciona información sobre la proliferación celular. La plataforma motorizada de exploración y el alimentador externo del portaobjeto permite la preselección automática de 80 portaobjetos sin interacción humana adicional.

Las células binucleadas y los MN son detectados por parámetros topográficos (por ejemplo, forma y tamaño de los núcleos, distancia entre los núcleos, tamaño de los objetos dentro de la región de interés) que se adaptan individualmente a la preparación mediante parámetros de clasificación que definen los parámetros morfológicos de la célula. Las comparaciones entre el recuento visual y el recuento automático revelan una menor frecuencia de MN para el recuento automático, pero los resultados están altamente correlacionados, como se determina por análisis de regresión ($r = 0,96$). Los resultados obtenidos con el software automático pueden utilizarse sin evaluación humana adicional. Aplicando una curva dosis-efecto para rayos gamma, establecida con el sistema automático, puede detectarse una dosis de 1 Gy con una exactitud de 0,2 Gy.

Después de una inspección visual de todas las células binucleadas identificadas, sólo el 2% de las células BN fueron mal clasificadas con respecto a su contenido de MN.

NOTA El 1% de las células BN clasificadas como células BN con MN no contenían MN, y alrededor de un 1% de las células BN clasificadas como células BN sin MN contenían MN. El porcentaje de positivos falsos y negativos falsos de MN con respecto a todos los MN identificados es, por supuesto, más alto.

La tasa de positivos falsos de células binucleadas fue del 6,3%, influido en parte por las células apoptóticas. Se estima que 60 muestras de sangre (120 portaobjetos) pueden procesarse en un turno de 12 h. La tasa de detección del sistema automático en relación con el recuento visual es de alrededor del 87%.

Otro sistema de análisis de imagen es comparable con el anterior pero basado en algoritmos de detección diferentes. Mientras el primero detecta las células binucleadas por la proximidad de dos núcleos, en este último sistema, se detecta primero el citoplasma de las células y en un segundo paso, se buscan en la celda los núcleos y los micronúcleos. Este sistema muestra un valor de positivos falsos para la detección de los MN superior al 1% y, por lo tanto, se recomienda una etapa de visualización interactiva como control de calidad y validación. El recuento automático resultó de forma consistente en menores frecuencias en las curvas dosis-efecto que en el recuento manual. La tasa de detección del sistema automáticos es de alrededor del 68,5%.

Anexo C (Informativo)

Instrucciones para el cliente (muestra)

PROCEDIMIENTOS PARA LA EXTRACCIÓN DE SANGRE PARA EL ANÁLISIS DE MICRONÚCLEOS

El análisis de la tasa de micronúcleos en los linfocitos de la sangre periférica humana es una alternativa al análisis dicéntrico para la evaluación biológica de la exposición a la radiación. Se utiliza del mismo modo cuando está ausente o no funciona un dosímetro físico de una persona o cuando la lectura del dosímetro físico se ha perdido o está en disputa. Para optimizar la recuperación de los linfocitos de la sangre, es muy importante que la sangre se extraiga y envíe según el siguiente protocolo:

- antes de la extracción de sangre, debería informarse al laboratorio para que pueda prepararse para su llegada y recogida. Se programa la hora de la extracción de la sangre con su recogida para envío para minimizar la duración de estas operaciones;
- debe informarse al flebotomista que todas las muestras de sangre deben extraerse en **tubos de heparina de litio o de sodio**, (por lo menos 5 ml). Ellos deben inmediatamente mecer suavemente los tubos durante 2 min para asegurar una mezcla adecuada y deben etiquetar los tubos con tu nombre y fecha de nacimiento;
- el sujeto debe completar el cuestionario, verificar cualquier prescripción o cualquier medicamento que esté tomando (fármaco, posología -véase la parte inferior de esta hoja) y documentar, si es posible, cualquier procedimiento de rayos-X o medicina nuclear experimentado en los últimos 2 años (véase la parte inferior de la hoja). El laboratorio también necesita saber si el sujeto fuma y, de ser así, durante aproximadamente cuánto tiempo (en años) y cuántos (por día);
- debe empaquetarse la muestra de sangre cuidadosamente para evitar la rotura de los tubos en el tránsito. También, la sangre debe mantenerse alrededor de 20 °C. **No deben congelarse las muestras de sangre**. Un método de mantener la sangre a temperatura ambiente es colocar los tubos en un paquete de gel que se le ha permitido estar a temperatura ambiente durante varias horas. Para garantizar que las muestras no se congelan durante el transporte (por ejemplo, transporte aéreo), el paquete debe marcarse en el exterior con "**MUESTRAS BIOLÓGICAS URGENTES - NO CONGELAR**". Para el transporte aéreo, el embalaje y etiquetado debe cumplir con las normativas vigentes (XXX). El paquete y los documentos de envío deben marcarse con "**NO SOMETER A RAYOS-X**" y debe incluirse en el paquete un dosímetro físico;
- inmediatamente después de la extracción de sangre, la muestra debe enviarse por expreso aéreo especial nocturno para que el laboratorio pueda recibir la sangre temprano a la mañana siguiente a la extracción de sangre. Contactar con el laboratorio para confirmar el envío e informarle del número de seguimiento del transporte aéreo. ESTO ES IMPORTANTE PARA EL SEGUIMIENTO DE LA MUESTRA;
- para obtener mejores resultados, debe recibirse la sangre dentro de las 24 h desde su extracción.

(Jefe del laboratorio de CBMN)

(Dirección del laboratorio CBMN)

Teléfono: (XXX) XXX-XXX

Fax: XXX-XXX (XXX)

Correo electrónico: name@company.com

Anexo D (Informativo)

Cuestionario de ejemplo

Información de la exposición para el análisis de micronúcleos

(A RELLENAR POR EL SUJETO o representante, por ejemplo, el médico responsable)

Yo, _____ (Nombre), nacido el _____ (día/mes/año) autorizo a donar una muestra de sangre para el propósito de la estimación de la tasa de micronúcleos inducido por exposición a la radiación ionizante.

Firma

Muestra de sangre extraída por: _____ Nombre del laboratorio: _____

Dirección del laboratorio: _____

Teléfono #: _____ Fax: _____ E-mail: _____

Fecha y hora de la extracción de la muestra de sangre: _____ (día/mes/año)

Datos de exposición: _____ **Trabajador expuesto a radiación o trabajador no expuesto a radiación**

1. Fecha y hora de la sobreexposición: _____ (día/mes/año y hora)

2. Lugar: _____ Compañía: _____

3. Descripción breve de la sobreexposición:

4. Exposición corporal total Exposición corporal parcial Contaminación interna

Valor de la dosis: _____ Parte del cuerpo: _____ Radionúclido

Valor de la dosis: _____ Valor de la dosis:

Aguda Fraccionada Prolongada

¿Cómo se obtuvo este valor de la dosis?

5. Tipo de radicación:

Rayos-X kV

γ ¿radionúclido?

α ¿radionúclido?

Neutrones fuente

Datos del paciente:

1. Exposición previa a través de la práctica médica:

Radioterapia Fecha, parte del cuerpo _____

Diagnosís por rayos-X Fecha, parte del cuerpo _____

Medicina nuclear Fecha, parte del cuerpo _____

2. Dolencia dentro de las 4 semanas anteriores a la extracción de sangre: _____

3. Ingesta de medicamentos:

Nombre del medicamento: _____ Dosis: _____ Duración: _____

4. Fumador: no: sí: número/día: _____

5. Enfermedades conocidas:

Sida Hepatitis

Resultados del análisis de los micronúcleos a enviar a:

Nombre: _____

Dirección: _____

Teléfono #: _____

Anexo E (Informativo)

Ejemplo de informe para evaluación individual

(fecha)

(nombre del solicitante)

(dirección del solicitante)

Teléfonos: (XXX) XXX-XXX

Fax: XXX-XXX (XXX)

Estimación de la dosis del Sr. John Doe:

Estimado Sr. Y

Este informe es para informarle de la evaluación citogenética de la dosis de radiación recibida por el Sr. John Doe, nacido (*fecha de nacimiento*). La evaluación citogenética fue solicitada (*fecha de la solicitud*) por las siguientes razones: (*a continuación, toda la información sobre las circunstancias de la exposición importantes para la evaluación de la dosimetría biológica*).

Se utilizó el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis para estimar la dosis de radiación aguda a todo el cuerpo recibida por un individuo. El ensayo fue realizado sobre las muestras de sangre recibidas en el laboratorio de análisis clínicos el 29 de junio de 1999 (extracción de sangre del Sr. Doe el 28 de junio de 1999). La incidencia esperada de micronúcleos en un **individuo normal, no expuesto** es de 2 a 36 en 1 000 células binucleadas (primera división).

El laboratorio evaluó al azar XXX células binucleadas y encontró XXX micronúcleos. Basándose en la interpolación de la curva dosis-respuesta normalizada para el Iridio-192 (calidad de radiación apropiada) y niveles de confianza del 95%, el laboratorio estima que el Sr. Doe no recibió más de XXX Gy (nivel superior de confianza del 95%) y no menos de XXX Gy (nivel inferior de confianza del 95%) con una dosis media de 0,XX Gy.

Si tiene alguna pregunta sobre esta evaluación, no dude en ponerse en contacto con el laboratorio.

Atentamente,

(Jefe del laboratorio de análisis clínicos)

(Dirección del laboratorio de análisis clínicos)

Teléfono: (XXX) XXX-XXX

Fax: XXX-XXX (XXX)

Correo electrónico: name@company.com

Anexo F (Informativo)

Ejemplo de informe para un grupo de individuos

Dr. Y Información médica - Confidencial

Hospital General

1 Main Street

Anytown, ON

Teléfono: **(555) 555-5555**

Fax: **(555) 555-4444**

REF: Estimación de la dosis para todos los irradiados potencialmente

Estimado Sr. Y

Este informe es para ponerles en conocimiento de la evaluación citogenética de la dosis de radiación recibida por los 10 individuos. Esta evaluación citogenética fue solicitada (fecha de la solicitud) por las siguientes razones: *(a continuación, toda la información sobre las circunstancias de la exposición importantes para la evaluación de la dosimetría biológica)*.

Se utiliza el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) para estimar la dosis de radiación aguda a todo el cuerpo recibida por un individuo. El ensayo fue realizado sobre las muestras de sangre y procesado bajo los números de código del caso proporcionados por el Dr. X utilizando el método de cultivo rutinario del laboratorio. La incidencia esperada de micronúcleos en un **individuo normal, no expuesto** es de XX micronúcleos (intervalo de XX a XX) en 1 000 células de linfocitos binucleados que han completado la división nuclear. El laboratorio evaluó al azar 200 células binucleadas (o 200 micronúcleos) para cada muestra de sangre obtenida de los 10 individuos. A continuación, se enumeran las estimaciones de las dosis incluyendo los niveles superior e inferior de confianza para cada individuo. El laboratorio utilizó una curva patrón de 200 kVp de rayos-X establecida en el laboratorio para estimar las dosis. Todas las dosis siguientes son estimaciones de la dosis estimada equivalente de rayos-X.

Nº de ID	Nº de micronúcleos	Nº de células binucleadas evaluadas	Dosis estimada Gy	Límite inferior de confianza del 95 %	Límite superior de confianza del 95 %
123	5	200	0,1	0,0	0,6
124	14	200	0,7	0,3	1,1
125	35	200	1,5	1,1	1,9
126	22	200	1,1	0,7	1,5
127	7	200	0,3	0,0	0,7
128	12	200	0,6	0,2	1,0
129	18	200	0,9	0,5	1,3
130	26	200	1,2	0,8	1,6
131	46	200	1,8	1,5	2,3
132	8	200	0,4	0,0	0,8

Si tiene alguna pregunta sobre esta evaluación, no dude en ponerse en contacto con el laboratorio.

Atentamente,

(Jefe del laboratorio de CBMN)

(Dirección del laboratorio CBMN)

Teléfono: (XXX) XXX-XXX

Fax: XXX-XXX (XXX)

Correo electrónico: name@company.com

Bibliografía

- [1] BONASSI S., FENECH M., LANDO C. et al. HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.* 2001, **37** pp. 31–45.
- [2] DARZYNKIEWICZ Z., SMOLEWSKI P., HOLDEN E., LUTHER E., HENRIKSEN M., FRANCOIS M. et al. Laser scanning cytometry for automation of the micronucleus assay. *Mutagenesis.* 2011, **26** (1) pp. 153–161.
- [3] DECORDIER I., PAPINE A., VANDE LOOCK K., PLAS G., SOUSSALINE F., KIRSCH-VOLDERS M. Automated image analysis of micronuclei by IMSTAR for biomonitoring. *Mutagenesis.* 2011, **26** (1) pp. 163–168.
- [4] DOLPHIN G.W. “Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods”, Handling of Radiation Accidents (Proc. Int. Symp. Vienna, 1969), IAEA, Vienna 215-224, 1969.
- [5] EVANS H.J. Chromosome aberrations induced by ionizing radiations. *Int. Rev. Cytol.* 1962, **13** pp. 221–321.
- [6] FENECH M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys.* 2010, **98** (2) pp. 234–243.
- [7] FENECH M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2007, **2** (5) pp. 1084–1104.
- [8] FENECH M., MORLEY A.A. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutat. Res.* 1985, **148** pp. 99–105.
- [9] FENECH M., MORLEY A.A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat. Res.* 1986, **161** pp. 193–198.
- [10] FENECH M., NEVILLE S., RINALDI J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutat. Res.* 1994, **313** pp. 203–207.
- [11] FENECH M., BONASSI S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis.* 2011, **26** (1) pp. 43–49.
- [12] FENECH M., CHANG W.P., KIRSCH-VOLDERS M., HOLLAND N., BONASSI S., ZEIGER E. Human MicroNucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 2003, **534** (1-2) pp. 65–75.
- [13] FENECH M., MORLEY A.A. Kinetochores detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutagenesis.* 1989, **4** (2) pp. 98–104.
- [14] IAEA, Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment. Technical Reports Series N°260, 1986.

- [15] IAEA, Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment, A Manual. Technical Reports Series N°405, 2001.
- [16] IAEA. *Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. A Manual*. Technical Document Publications, 2011.
- [17] Lambert, B., Hansson, K., Lindsten, J., Sten, M., AND WERELIUS. B., Bromodeoxyuridine-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Hereditas*. 1976, **93** pp. 163–174.
- [18] LLOYD D. *Appl. Radiat. Isot.* 2000, **52** pp. 1107–1112.
- [19] LLOYD D.C., EDWARDS A.A. Chromosome aberrations in human lymphocytes: Effect of radiation quality, dose and dose rate. In: *Radiation-induced Chromosome Damage in Man*, (ISHISHARA T., SASAKI M.S., eds.). Alan R. Liss, New York, 1983, pp. 23–49.
- [20] MCNAMEE J.P., FLEGAL F.N., GREENE H.B., MARRO L., WILKINS R.C. Validation of the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay for use as a triage biological dosimetry tool. *Radiat. Prot. Dosimetry*. 2009, **135** (4) pp. 232–242.
- [21] MOORHEAD P.S., NOWELL P.C., MELLMANN W.J., BATTIPS D.M., HUNGERFORD D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 1960, **20** pp. 613–616.
- [22] NORPPA H., FALCK G.C. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*. 2003, **18** pp. 221–233.
- [23] PAILLOLE N., VOISIN P. *Mutat. Res.* 1998, **413** (1) pp. 47–56. Available at: Is micronuclei yield variability a problem for overexposure dose assessment to ionizing radiation?.
- [24] PAPWORTH D.G. Curve fitting by maximum likelihood. *Radiat. Bot.* 1975, **15** pp. 127–140.
- [25] PERRY P., WOLFF S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. 1974, **251** pp. 156–158 [London].
- [26] PROSSER J.S., MOQUET J.E. The effect of blood storage on differential chromosome staining of human lymphocytes. *Experientia*. 1983, **39** pp. 778–780.
- [27] PURROT R.J., VULPIS N., LLOYD D.C. The influence of incubation temperature on the rate of human lymphocyte proliferation in vitro. *Experientia*. 1981, **37** pp. 407–408.
- [28] PURROTT R.J., VULPIS N., LLOYD D.C. Chromosome dosimetry. The influence of culture media on the proliferation of irradiated and unirradiated human lymphocytes. *Radiat. Prot. Dosimetry*. 1981, **1** pp. 203–208.
- [29] RODRIGUES M.A., BEATON-GREEN L.A., KUTZNER B.C., WILKINS R.C. Automated analysis of the cytokinesis-block micronucleus assay for radiation biodosimetry using imaging flow cytometry. *Radiat. Environ. Biophys.* 2014, **53** (2) pp. 273–282.
- [30] ROSSNEROVA A., SPATOVA M., SCHUNCK C., SRAM R.J. Automated scoring of lymphocyte micronuclei by the MetaSystems Metafer image cytometry system and its application in studies of human mutagen sensitivity and biodosimetry of genotoxin exposure. *Mutagenesis*. 2011, **26** (1) pp. 169–175.

- [31] SASAKI M.S., MIYATA H. Biological dosimetry in atomic bomb survivors. *Nature*. 1968, **220** pp. 1189–1193 [London].
- [32] SAVAGE J.R.K. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.* 1976, **13** pp. 103–122.
- [33] SCHUNCK C., JOHANNES T., VARGA D., PLESCH A. New developments in automated cytogenetic imaging: unattended scoring of dicentric chromosomes, micronuclei, single cell gel electrophoresis, and fluorescence signals. *Cytogenet. Genome Res.* 2004, **104** pp. 383–389.
- [34] SENTHAMIZHCHELVAN S., PANT G.S., RATH G.K., JULKA P.K., NAIR O., PRABHAKAR R. et al. Biological estimation of dose in hemi-body irradiation of cancer patients by cytogenetic analysis. *Health Phys.* 2008, **94** (2) pp. 112–117.
- [35] SENTHAMIZHCHELVAN S., PANT G.S., RATH G.K., JULKA P.K., NAIR O. Biodosimetry using micronucleus assay in acute partial body therapeutic irradiation. *Phys. Med.* 2009, **25** (2) pp. 82–87.
- [36] THIERENS H., VRAL A., DE RIDDER L., TOUIL N., KIRSCH-VOLDERS M., LAMBERT V. et al. Inter-laboratory comparison of cytogenetic endpoints for the biomonitoring of radiological workers. *Int. J. Radiat. Biol.* 1999, **75** (1) pp. 23–34.
- [37] TUCKER J.D., NATH J., HANDO J.C. Activation status of the X chromosome in human micronucleated lymphocytes. *Hum. Genet.* 1996, **97** pp. 471–475.
- [38] TUCKER J.D., VADAPALLI M., JOINER M.C., CEPPI M., FENECH M., BONASSI S. Estimating the lowest detectable dose of ionizing radiation by the cytokinesis-block micronucleus assay. *Radiat. Res.* 2013, **180** (3) pp. 284–291.
- [39] VARGA D., JOHANNES T., JAINTA S., SCHUSTER S., SCHWARZ-BOEGER U., KIECHLE M. et al. An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis. *Mutagenesis*. 2004, **19** pp. 391–397.
- [40] VOISIN P., BENDERITTER M., CLARAZ M., CHAMBRETTE V., SOROKINE-DURM I., DELBOS M. et al. The cytogenetic dosimetry of recent accidental overexposure. *Cellular Molecular Biology (Noisy-le-Grand)*. 2001, **47** (3) pp. 557–564.
- [41] VOISIN P., BARQUINERO F., BLAKELY B., LINDHOLM C., LLOYD D., LUCCIONI C. et al. Towards a standardization of biological dosimetry by cytogenetics. *Cellular Molecular Biology (Noisy-le-grand)*. 2002, **48** (5) pp. 501–504.
- [42] VRAL A., FENECH M., THIERENS H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*. 2011, **26** (1) pp. 11–17.
- [43] WILLEMS P., AUGUST L., SLABBERT J., ROMM H., OESTREICHER U., THIERENS H. et al. Automated micronucleus (MN) scoring for population triage in case of large scale radiation events. *Int. J. Radiat. Biol.* 2010, **86** pp. 2–11.

Para información relacionada con el desarrollo de las normas contacte con:

Asociación Española de Normalización
Génova, 6
28004 MADRID-España
Tel.: 915 294 900
info@une.org
www.une.org

Para información relacionada con la venta y distribución de las normas contacte con:

AENOR INTERNACIONAL S.A.U.
Tel.: 914 326 000
normas@aenor.com
www.aenor.com



organismo de normalización español en:

