

RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Lima, 16 de Abril de 2018

VISTO el Expediente N° 6621-2018 con el Oficio N° 024-2018-UTR/HCH, remitido por el Jefe de la Unidad de Trasplante Renal, respecto a la Aprobación del "Documento Técnico: Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados (POEs) del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular 2018 del Hospital Cayetano Heredia", y;

CONSIDERANDO:

Que, los artículos I y II del Título Preliminar de la Ley N° 26842, Ley General de Salud, establecen que la salud es condición indispensable del desarrollo humano y medio fundamental para alcanzar el bienestar individual y colectivo. La protección de la salud es de interés público, siendo responsabilidad del Estado regularla, vigilarla y promoverla;



Que, mediante Resolución Ministerial N° 850-2016-MINSA del 28 de octubre del 2016, se aprueba las "Normas para la elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud", la cual establece disposiciones relacionadas con los procesos de planificación, formulación o actualización, aprobación, difusión, implementación y evaluación de los Documentos Normativos que expide el Ministerio de Salud. Estableciendo que la Norma Técnica de Salud (NTS) es el Documento Normativo de mayor jerarquía que emite el Ministerio de Salud y que regula los diferentes ámbitos de la Salud Pública, incluyendo la prevención, promoción, recuperación, rehabilitación y otros aspectos sanitarios en el marco de las funciones y rectoras del MINSA. Las NTS establecen disposiciones sobre intervenciones, estrategias, objetivos, procesos tecnológicos, procedimientos y/o acciones, que contribuyen a la mejor prestación de servicios en los establecimientos de salud, así como a mejorar la calidad y seguridad de las atenciones brindadas, en cumplimiento de disposiciones legales vigentes. También establecen regulaciones referidas a otros aspectos sanitarios en el ámbito del sector salud, en salvaguarda de la Salud Pública (...);



Que, mediante Resolución Ministerial N° 999-2007/MINSA, de fecha 29 de noviembre del 2007, se aprobó la Norma Técnica de Salud N° 061-MINSA/DGSP-V.01, "Norma Técnica de Salud para la Acreditación de Establecimientos de Salud Donadores – Trasplantadores"; el mismo que tiene como finalidad optimizar el proceso de donación-trasplante de órganos y garantizar la calidad de los trasplantes y cuyo objetivo es establecer las normas para la acreditación de los Establecimientos de Salud Donadores – Trasplantadores;

Que, el ítem 6.5 de la Norma Técnica de Salud citada en el párrafo precedente, modificado por la Resolución Ministerial N° 289-2012/MINSA, de fecha 11 de abril del 2012, establece que las solicitudes de acreditación de los establecimientos de salud y de los laboratorios de histocompatibilidad se formularán ante la Dirección General de Donaciones, Trasplantes y Banco de Sangre (ex Organización Nacional de Donación y Trasplante). Estas solicitudes incluirán una memoria descriptiva en la que deberán constar: a) Referencia a la organización y funcionamiento de los servicios que se prestarán, b) Listado de equipamiento biomédico con el que se cuenta, c) Currículum vitae del personal que prestara servicios, el cual debe incluir la acreditación de la experiencia en el tipo de trasplante solicitado, **d) Guías de práctica clínica y de procedimientos del órgano a trasplantar**, e) identificación de la persona o personas responsables técnicas en el centro de cada una de las modalidades de desarrollo de extracción y trasplante de órganos para las que se solicite acreditación del centro previa comprobación de que se cumplen las condiciones y requisitos que establece la norma vigente y f) copia de la certificación de categorización del establecimiento de salud;

Que, resulta necesario aprobar el Documento Técnico: Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados (POEs) del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular 2018 del Hospital Cayetano Heredia, el cual tiene como objetivos: 1) Describir los POEs para realizar los ensayos de Inmunología y Biología Molecular relacionados al Trasplante Renal en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular, de la Unidad de Trasplante Renal y 2) Facilitar el proceso de inducción y adiestramiento del personal nuevo y de orientación al personal en servicio, permitiéndoles conocer con claridad los procedimientos del trabajo en el laboratorio. El cumplimiento del presente Manual de POEs comprende a todo el personal que labora en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular el contribuye a lograr que se cumplan con los objetivos del servicio que están establecidos en el Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Cayetano Heredia;

Que, el literal i) del artículo 6° del Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Cayetano Heredia; dispone que la Dirección General está a cargo de un Director General y tiene como una de sus funciones expedir Resoluciones Directorales en los asuntos de su competencia;

Estando a lo propuesto, por el Jefe de la Unidad Trasplante Renal, lo recomendado por la Jefa de la Oficina de Gestión de la Calidad y lo opinado por la Asesoría Jurídica en el Informe N° 214-2018-OAJ/HCH;

Con visación del Jefe de la Unidad Trasplante Renal, de la Jefa de la Oficina de Gestión de la Calidad y de la Jefa de la Oficina de Asesoría Jurídica;

De conformidad con lo dispuesto en el TUO de la Ley del Procedimiento Administrativo General, Ley N° 27444 y las facultades previstas en el Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Cayetano Heredia aprobado por Resolución Ministerial N° 216-2007/MINSA;

SE RESUELVE:

Artículo 1°.- APROBAR el Documento Técnico: "Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados (POEs) del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular 2018 del Hospital Cayetano Heredia; el mismo que se adjunta y forma parte integrante de la presente resolución directoral.

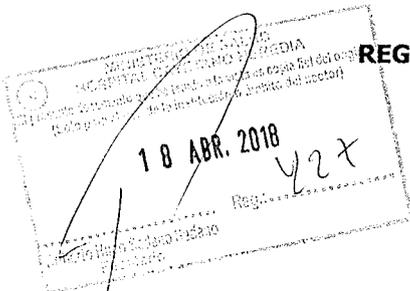
Artículo 2°.- ENCARGAR al Jefe de la Unidad de Trasplante Renal, adopte las acciones administrativas para el desarrollo de la Directiva, aprobada en el artículo primero de la presente resolución.

Artículo 3°.- DISPONER que la Oficina de Comunicaciones efectúe la publicación y difusión de la presente Resolución Directoral en el Portal de Transparencia Estándar del Hospital Cayetano Heredia.

REGÍSTRESE Y COMUNÍQUESE.

() ACPR/BIC/ACV
DISTRIBUCIÓN:
() DG
() UTR
() OAJ
() OCOM

MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL CAYETANO HEREDIA
Dra. AIDA CECILIA PALACIOS RAMIREZ
DIRECTORA GENERAL
C.M.P. 23579 R.N.E. 9834





PERÚ

Ministerio de Salud

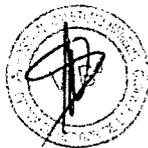
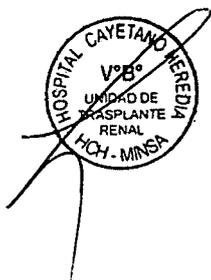
Hospital
Cayetano Heredia



Documento Técnico:
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
OPERATIVOS ESTANDARIZADOS
(POEs)

LABORATORIO DE
HISTOCOMPATIBILIDAD Y BIOLOGIA
MOLECULAR

LHBM-UTR



2018





PERÚ Ministerio de Salud

Hospital
Cayetano Heredia



**LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD
Y BIOLOGIA MOLECULAR (LHBM)
UNIDAD DE TRASPLANTE RENAL (UTR)
HOSPITAL CAYETANO HEREDIA (HCH)**



Documento Técnico:

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS
ESTANDARIZADOS (POEs)
EN HISTOCOMPATIBILIDAD Y
BIOLOGIA MOLECULAR**

PERSONAL RESPONSABLE:

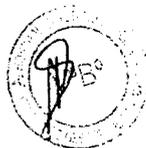
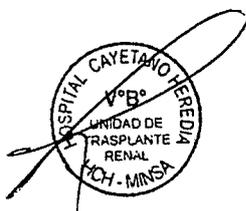
VICTOR MANUEL NEYRA CHAGUA. Dr. Mg. Blgo.
ROGER ALDO CENTENO DIAZ. Mg. Med.

JEFE UNIDAD DE TRASPLANTE RENAL:

LUIS ZEGARRA MONTES. Dr. Mg. Med. UPCH

Enero 2018

Lima – Perú





INDICE

I.	INTRODUCCION.	Pág. 1
II.	OBJETIVO.	1
III.	BASE LEGAL.	1
IV.	AMBITO DE APLICACION.	2
V.	CONTENIDO.	2

~~5.1. SISTEMA DE LA GESTION DE LA CALIDAD EN HISTOCOMPATIBILIDAD.~~

5.1.1.	Selección e identificación del paciente.....	2
5.1.2.	Selección e identificación del donante.....	2
5.1.3.	Metodologías de las pruebas empleadas.....	3
5.1.4.	Control de los reactivos utilizados.....	3
5.1.5.	Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados (POEs).....	3
5.1.6.	Control de equipos y materiales.....	3
5.1.7.	Control interno.....	4
5.1.8.	Control externo.....	4
5.1.9.	Obtención y manejo de las muestras para Histocompatibilidad.....	4
5.1.10.	Control de bioseguridad.....	5
5.1.11.	Informe de los resultados y archivos.....	5

5.2. PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS (POEs).

5.2.1. ENSAYOS PRE-ANALITICOS.

POE-001.	Obtención de Muestra para ensayos Serológicos.....	7
POE-002.	Extracción de ADN humano a partir de sangre periférica.....	10
POE-003.	Cuantificación de ADN mediante fluorometría.....	14
POE-004.	Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) por método de Gradientes.....	17
POE-005.	Aislamiento de Linfocitos T y B de sangre periférica con perlas Inmuno- magnéticas.....	21
POE-006.	Aislamiento de Linfocitos T y B de ganglios y bazo con perlas Inmuno-magnéticas.....	25

5.2.2. ENSAYOS CELULARES.

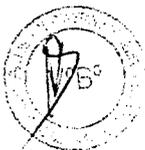
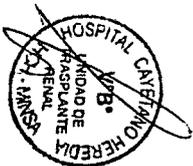
POE-007.	Prueba de Reacción Cruzada o Cross-Match estándar.....	29
----------	--	----

5.2.3. ENSAYOS SEROLOGICOS.

POE-008.	Tamizaje de anticuerpos anti-HLA clase I y II por LUMINEX®.....	32
POE-009.	Panel de Anticuerpos Reactivos (PRA) clase I y II por LUMINEX®.....	40
POE-010.	Determinación de Antígeno Aislado (SA) clase I y II por LUMINEX®.....	48

5.2.4. ENSAYOS MOLECULARES

POE-011.	Tipificación Molecular HLA clase I y II por PCR-SSP, Baja resolución.....	56
POE-012.	Tipificación Molecular HLA Clase I y II por PCR-SSO (LUMINEX®)	





PERÚ

Ministerio de Salud

Hospital
Cayetano Heredia



Baja y mediana resolución.....	60
POE-013. Tipificación Molecular HLA Clase I y II por PCR-SBT	
Alta resolución por secuenciamento.....	66

5.2.5. ENSAYOS ESPECIALES EN HISTOPATOLOGIA (BIOPSIAS RENALES)

POE-014. Coloración HE.....	72
POE-015. Coloración PAS.....	75
POE-016. Coloración Tricrómica de Masson.....	78
POE-017. Coloración de Jones.....	81
POE-018. Coloración Ziehl-Neelsen.....	84
POE-019. Inmunofluorescencia Indirecta para C4d.....	87

VI. ANEXOS

F01. Toma de muestra.....	92
F02. Resultados para Trasplante Vivo-Relacionado.....	93
F03. Resultados para Receptor en Lista de Espera.....	94
F04. Resultados para Operativo Donante Cadavérico.....	95
F05. Resultado tamizaje, PRA, pre y post-trasplante.....	96
F06. Resultado Antígeno Aislado (SA), pre y post-trasplante.....	97
F07. Resultado Inmunofluorescencia Indirecta IFI-C4d.....	98
Flujograma de trabajo modalidad donante vivo relacionado y cadavérico.....	99





I. INTRODUCCION.

El Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM), de la Unidad de Trasplante Renal, realiza estudios de tipificación molecular HLA y búsqueda de anticuerpos anti HLA, en pacientes en preparación, trasplantados y post-trasplantados Renales.

La actividad de este laboratorio, utilizando técnicas de biología molecular e inmunología, está relacionada principalmente con el trasplante Renal. Sin embargo, destina parte de su actividad al diseño de nuevas pruebas, protocolos y proyectos de investigación.

Actualmente, está implementado con nuevas tecnologías de estudio molecular e inmunológico del HLA, basadas en la plataforma LUMINEX®, así mismo cuenta con un secuenciador de ADN, proporcionando resultados a un nivel muy alto de especificidad y sensibilidad.

II. OBJETIVOS.

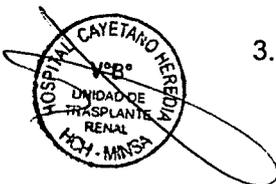
El presente Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados (POEs) es un documento técnico normativo de gestión institucional que tiene como objetivos:

1. Describir los POEs para realizar los ensayos de Inmunología y Biología Molecular relacionados al trasplante Renal en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular, de la Unidad de Trasplante Renal, del Hospital Cayetano Heredia.
2. Facilitar el proceso de inducción y adiestramiento del personal nuevo y de orientación al personal en servicio, permitiéndoles conocer con claridad los procedimientos del trabajo en el laboratorio.

El cumplimiento del presente Manual de POEs comprende a todo el personal que labora en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular el cual contribuye a lograr que se cumplan los objetivos del servicio que están establecidos en el Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Cayetano Heredia.

III. BASE LEGAL.

- 3.1. Ley N°28189-Ley General de Donación y Trasplante de Órganos y/o Tejidos Humanos.
- 3.2. Ley N°29471-Ley que Promueve la Obtención, la Donación y Trasplante de Órganos o Tejidos Humanos.
- 3.3. Decreto supremo N°011-2010-SA-Reglamento de la Ley que Promueve la obtención, la Donación y el Trasplante de Órganos o Tejidos Humanos.





Resolución Ministerial N°999-2007/MINSA, que aprueba la NTS N°061-MINSA/DGSP.V.01. "Norma Técnica de salud para la Acreditación de Establecimientos de Salud Donadores-Trasplantadores".

3.4. Resolución Ministerial N°581-2015/MINSA, que modifica la NTS N°061-MINSA/DGSP.V.01. "Norma Técnica de Salud para la Acreditación de Establecimientos de Salud Donadores-Trasplantadores, aprobada por la Resolución Ministerial N°999-2007/MINSA.

IV. AMBITO DE APLICACION.

El ámbito de aplicación de este manual POEs en Histocompatibilidad y Biología Molecular es para Laboratorios del MINSA debidamente acreditados según NTS N°061-MINSA/DGSP.V.01. "Norma Técnica de salud para la Acreditación de Establecimientos de Salud Donadores-Trasplantadores".

V. CONTENIDO.

5.1. SISTEMAS DE GESTION DE CALIDAD EN HISTOCOMPATIBILIDAD.

El aseguramiento de la calidad en los servicios del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM) mediante la participación del personal, el control profesional, educación continua y el cumplimiento de estándares de desempeño establecidos, para brindar una atención oportuna con calidad y calidez a nuestros pacientes.

Se define como calidad integral o sistemas de gestión de calidad, a todas las actividades y funciones encaminadas a conseguir la calidad. Cada paso de los procesos debe ser controlado para minimizar la probabilidad de que los resultados no cumplan con las especificaciones establecidas. El sistema se proyecta a enmarcar todas las consideraciones legales (Legislación sobre Trasplante de Órganos y Tejidos y el Reglamento respectivo) y acuerdos consensuados de los Equipos Trasplantadores del Ministerio de Salud a futuro.

El objetivo de aplicación de los sistemas de calidad en Histocompatibilidad está dirigido a una serie de puntos críticos o áreas que influyen en la calidad final, siendo estos los que se detallan a continuación:

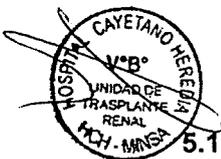
5.1.1. SELECCION E IDENTIFICACION DE PACIENTES.

Los pacientes en lista de espera de la Unidad de Trasplante Renal (UTR) son identificados en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular mediante una ficha en donde se consigna sus datos generales y ciertos datos clínicos de interés del Laboratorio.

En esta ficha se registrará la fecha de la toma de muestra, el o los exámenes que son solicitados, y posteriormente los resultados de los mismos. En la ficha se consigna la codificación de las muestras de suero y/o ADN de los pacientes en lista de espera de la UTR y su evolución hasta la fecha de su Trasplante.

Esta información es transcrita a una base de datos en un software confeccionado para el caso.

5.1.2. SELECCION E IDENTIFICACION DE DONANTES.





Los datos requeridos de los posibles donantes para Trasplante Renal (sea vivo-relacionado y/o cadavérico), son consignados en una ficha. Igualmente, la fecha de la toma de muestra, el o los exámenes y los resultados de los mismos. Luego estos datos son transcritos a la base de datos del laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular.

5.1.3. METODOLOGIAS DE LAS PRUEBAS EMPLEADAS.

Los estudios celulares de Histocompatibilidad (Prueba Cruzada Tisular o Cross Match), se realizarán por la metodología estándar de Micro-linfocitotoxicidad o CDC (Citotoxicidad dependiente de Complemento).

Para el caso de los estudios serológicos de la existencia de Anticuerpos reactivos contra antígenos HLA, se tienen las pruebas de Tamizaje, Anticuerpos Reactivos contra Panel (PRA), Antígeno Aislado (SA), y Anticuerpos Donante Especifico (DSA), ensayos que se realizarán mediante reacción antígeno-anticuerpo, analizándose luego en la plataforma LUMINEX®.

Los estudios moleculares de Histocompatibilidad que involucran la amplificación del ADN se realizarán por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), la identificación y tipificación molecular HLA de Clase I y II de los Loci; A, B y DRB1 respectivamente, se realizarán a baja resolución por PCR-SSP (Primers Específicos de Secuencia), mediana resolución por PCR-SSO LUMINEX® (Oligonucleótidos / Sondas Específicos de Secuencia) y alta resolución por PCR-SBT (Tipificación Basado en Secuenciamiento). Estas metodologías están ampliamente descritas en los Manuales de Procedimientos.

5.1.4. CONTROL DE REACTIVOS UTILIZADO.

Actualmente la información sobre los alelos y haplotipos, pruebas celulares y serológicas en histocompatibilidad es amplia y compleja, por lo cual los reactivos que son adquiridos deberán de ser de marcas validadas y con denominación "in Vitro Diagnostic" (IVD) y certificadas, para garantizar un trabajo de calidad en todos los procedimientos del laboratorio de histocompatibilidad; la entrega de los mismos deberá hacerse con fecha de caducidad prolongada.

Los reactivos para la tipificación molecular y serología deberán ser enviados con suficiente cantidad de hielo seco que garantice la cadena de frío, para su óptima conservación. Para verificar la calidad de los reactivos, estos son probados con nuestros controles internos.

5.1.5. MANUALES DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS (POEs).

Se adjunta los manuales POEs a la documentación del Laboratorio de Histocompatibilidad.

5.1.6. CONTROL DE EQUIPOS Y MATERIALES.

Existe una programación anual de mantenimiento preventivo de equipos del LHBM, esta programación es elaborada conjuntamente con el Servicio de Mantenimiento del HNCH y su regularidad depende de la especificación de cada equipo.





El Servicio de mantenimiento cuenta con el personal de emergencia para resolver cualquier eventualidad.

El control de temperatura de las congeladoras y refrigeradora se realiza al iniciar y al finalizar la jornada diaria programada mediante un registro impreso adjunto a cada equipo. Las congeladoras cuentan con alarma auditiva y están designadas ya sea para reactivos, serotecas y/o ADNteca.

Los equipos menores del LHBM tales como pipetas automáticas, pipetas de Hamilton y otros, tienen un control trimestral o cuando se observe algún problema.

5.1.7. CONTROL INTERNO.

El control interno se realiza designando al personal del LHBM con una muestra anónima cuya tipificación solo conoce el Jefe del Laboratorio, se realiza cada 6 meses.

5.1.8. CONTROL EXTERNO.

En fase de implementación con un centro de referencia nacional o internacional reconocido y acreditado.

5.1.9. OBTENCION Y MANEJO DE MUESTRAS PARA HISTOCOMPATIBILIDAD.

Según sea el caso, como se describe a continuación:

- Prueba Cruzada o CrossMatch para Paciente (receptor): muestra de sangre periférica SIN anticoagulante. Volumen requerido de sangre 7 a 10 mL.
- Prueba Cruzada o CrossMatch para Donante Vivo: muestra de sangre periférica con EDTA o ACD. Volumen requerido de 7 a 10 mL.
- Prueba Cruzada o CrossMatch para Donante Cadavérico: *Ganglios* (2 a 3 ganglios) y Bazo (cuña de aproximadamente 5 g) en fresco, preservado en solución salina y refrigerado.
- Búsqueda de anticuerpos anti-HLA clase I y II: Muestra de sangre periférica SIN anticoagulante. Volumen requerido de sangre 7 a 14 mL.
- Tipificación Molecular de HLA clase I y II (HLA-A, -B, -DR): Muestra de sangre periférica con EDTA o ACD. Volumen requerido de 7 a 10 mL.

❖ **OBTENCION Y MANIPULACION:** En la obtención de muestras para Histocompatibilidad es importante brindar información al paciente y/o donantes de los exámenes que se les va a realizar y las muestras que se requieren para ello.

En caso de pacientes o donantes pediátricos crear un ambiente de confianza y en lo posible reducir el volumen de las muestras a la mitad.

La obtención de las muestras de histocompatibilidad serán tomadas teniendo en cuenta las normas básicas de bioseguridad; utilizar guantes, desinfectar el área a punzar, utilizar agujas descartables, tubos estériles al vacío, se contará con el depósito para descartar agujas y otros.

Las muestras para histocompatibilidad son tomadas en ayunas tanto al paciente como al donante en tubos al vacío, debidamente identificados, nombre, apellidos y fecha. Posteriormente son registradas en el LHBM e ingresados al Registro digital en la CPU.





❖ **TRANSPORTE:** Cuando las muestras son tomadas en otro Centro fuera del HCH pero en la ciudad de Lima, se transportan a temperatura ambiente a la brevedad posible. Si son enviadas de provincias los sueros para la Prueba Cruzada Tisular y/o Anticuerpos Anti-HLA deberán ser transportadas en un contenedor con suficiente cantidad de hielo. Las muestras para el HLA molecular se enviarán a temperatura ambiente evitando su hemolisis, deberán utilizar un medio de transporte que garantice la entrega inmediata de las muestras. Solo se reciben muestras con fichas debidamente llenas.

❖ **PROCESAMIENTO:** Las muestras deberán ser procesadas con el cuidado y las precauciones debidas (material contaminante).

Los residuos o restantes de las muestras son descartados en las cajas de bioseguridad y enviados para su incineración. La mesa de trabajo deberá ser desinfectado con hipoclorito de sodio al 5% antes y después del trabajo. Los materiales que son re-usables (pipetas Hamilton, bandejas etc.) son guardados limpios. El orden y la pulcritud en el trabajo son una norma y una cultura de laboratorio.

5.1.10. CONTROL DE BIOSEGURIDAD.

El LHBM se rige por el Manual de Bioseguridad del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular aprobado por el HCH. El personal en pleno deberá tener conocimiento y poner en práctica las normas que allí se definen, el Manual deberá ser revisado anualmente por el Jefe y el personal del LHBM.

5.1.11. INFORME DE RESULTADOS Y ARCHIVOS.

Los resultados de las pruebas de Histocompatibilidad deben ser corroborados por profesional de la salud del LHBM que no haya realizado las pruebas, cualquier ocurrencia será anotada en la hoja de lectura, consignando ambos su firma y fecha.

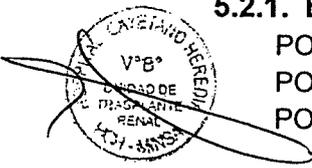
Luego son transcritos a la ficha del paciente para ser presentado al Coordinador de Laboratorio para su revisión y firma tanto del médico patólogo, como del Biólogo Molecular responsable de la prueba. El resultado es enviado a la Coordinación de la Unidad de Trasplante Renal (UTR-HCH) para su archivamiento en la Historia Clínica del paciente, una copia es archivada en el LHBM.

Si el o los exámenes son solicitados por otro hospital del MINSA o particular deberá existir un convenio y debe ser autorizado por las autoridades responsables del SIS y del HCH. El archivo de los resultados, hojas de lectura, registros, cuadernos de resultados, serán guardados por 3 años como máximo.

5.2. PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS (POEs).

5.2.1. ENSAYOS PRE-ANALITICOS.

- POE-001. Obtención de Muestra para ensayos Serológicos.
- POE-002. Extracción de ADN humano a partir de sangre periférica.
- POE-003. Cuantificación de ADN mediante fluorometría.





POE-004. Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) por método de Gradientes.

POE-005. Aislamiento de Linfocitos T y B de sangre periférica con perlas Inmuno-magnéticas.

POE-006. Aislamiento de Linfocitos T y B de ganglios y bazo con perlas Inmuno-magnéticas.

5.2.2. ENSAYOS CELULARES.

POE-007. Prueba de Reacción Cruzada o Cross-Match estándar.

5.2.3. ENSAYOS SEROLOGICOS.

POE-008. Tamizaje de anticuerpos anti-HLA clase I y II por LUMINEX®.

POE-009. Panel de Anticuerpos Reactivos (PRA) clase I y II por LUMINEX®.

POE-010. Antígeno Aislado (SA) clase I y II por LUMINEX®.

5.2.4. ENSAYOS MOLECULARES.

POE-011. Tipificación Molecular HLA clase I y II por PCR-SSP, Baja resolución.

POE-012. Tipificación Molecular HLA clase I y II por PCR-SSO (LUMINEX®) Baja y mediana resolución.

POE-013. Tipificación Molecular HLA clase I y II por PCR-SBT alta resolución por Secuenciamiento.

5.2.5. ENSAYOS ESPECIALES EN HISTOPATOLOGIA (BIOPSIAS RENALES).

POE-014. Coloración HE.

POE-015. Coloración PAS.

POE-016. Coloración Tricrómica de Masson.

POE-017. Coloración de Jones.

POE-018. Coloración Ziehl-Neelsen.

POE-019. Inmunofluorescencia Indirecta para C4d.

VI. ANEXOS.

F01. Toma de muestra.

F02. Resultados para Trasplante Vivo-Relacionado.

F03. Resultados para Receptor en Lista de Espera.

F04. Resultados para Operativo Donante Cadavérico.

F05. Resultado tamizaje, PRA, pre y post-trasplante.

F06. Resultado Antígeno Aislado (SA), pre y post-trasplante.

F07. Resultado Inmunofluorescencia Indirecta IFI-C4d.

Flujograma de trabajo modalidad donante vivo relacionado y cadavérico.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	OBTENCION DE MUESTRAS PARA ENSAYOS SEROLOGICOS	POE-001-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	7	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Determinar el procedimiento a seguir por el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM) en la obtención de suero sanguíneo de manera segura, oportuna y eficiente, evitando riesgos de contaminación y pérdidas.

ALCANCE

Este procedimiento describe la manera de obtener, procesar y almacenar las muestras de suero sanguíneo. Aplica para muestras de pacientes ambulatorios, particulares, hospitalizados y de emergencia que acuden al Hospital Cayetano Heredia (HCH) y requieran análisis posteriores.

RESPONSABILIDAD

Biólogo Molecular

DEFINICIONES

SUERO SANGUINEO: (o suero flemático) es el componente de la sangre resultante tras permitir la coagulación de esta y eliminar el coagulo de fibrina y otros componentes. El suero es más claro que el plasma debido a una mucha menor presencia de proteínas, siendo estas sustancias que pueden interferir en algunas pruebas reaccionando con el reactivo empleado produciendo resultados inexactos. La presencia de una mayor cantidad de proteína hace que el suero sea más turbio.

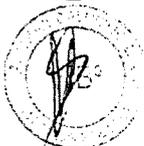
Puede ser almacenado entre 2-6 °C por varios días o, alternativamente, puede ser almacenado a menor temperatura (-80°C) por varios meses.

CONDICIONES GENERALES

- El tubo de recogida de sangre debe ser etiquetado con un código único que no contenga ningún dato identificativo del paciente.
- Se debe emplear tubos de colección sin anticoagulante.
- Se debe registrar el día y hora de extracción de la sangre.
- Se debe registrar el día y hora del inicio del procesado de la muestra para la obtención del suero.
- Como regla general las muestras de sangre debería ser procesadas y almacenadas dentro de las 4 a 24 horas de haber sido tomadas.
- En el caso de muestras de sangre que lleguen de fuera de las instalaciones del HCH, solo se aceptaran muestras frescas debidamente rotuladas y guardando la cadena de frio. El frasco debe estar sellado herméticamente.

MATERIALES

- Tubos de extracción sanguínea sin anticoagulante.
- Gradillas para tubos de extracción sanguínea.
- Pipetas de plástico tipo Pasteur estériles.
- Criotubos estériles.
- Gradillas para criotubos.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	OBTENCION DE MUESTRAS PARA ENSAYOS SEROLOGICOS	POE-001-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	8	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Cajas de plástico para crio almacenaje.
- Bolsas de bioseguridad o contenedor de desechos.
- Marcadores y bolígrafos.
- Mandiles y guantes para proteger al personal de manipulación de la muestra.

EQUIPOS

- Cabina de Flujo Laminar
- Centrifuga de tubos con adaptadores para tubos de extracción sanguínea.
- Congelador -20°C y/o -80°C.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

1. Verificar la Información del paciente, siempre manteniendo la privacidad de este, y asegurar la correcta relación de los tubos de extracción sanguínea debidamente etiquetados con la información del paciente.
2. Extraer sangre recogiéndola en el tubo de extracción sanguínea (sin anticoagulante) previamente Identificado.
3. Inmediatamente tras la extracción Invertir suavemente el tubo para favorecer la coagulación.
4. Transportar la muestra al laboratorio para su procesamiento en un tiempo no mayor a 1 hora después de la extracción, manteniendo las pautas de seguridad para el transporte de material biológico.

CALIBRACIÓN

Todo el procedimiento es manual.

CONTROL DE CALIDAD

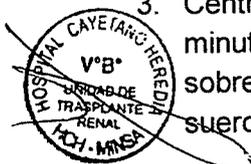
Una vez obtenido el suero sanguíneo este será alicuotado en cabina de flujo laminar previo al crio almacenaje.

LIMITACIONES

Cuando la sangre entera no se procesa inmediatamente, debe conservarse refrigerada (entre 4°C a 8°C).

PROCEDIMIENTO

1. Después de la extracción, permitir que la sangre se coagule durante aprox. 30 minutos a temperatura ambiente (20°C - 25°C). Cuanto más tiempo se deje para que la coagulación tenga lugar, mayor cantidad de suero se obtendrá aunque nunca más del 40 % del volumen total. Como regla general a menor temperatura mayor tiempo para que el coagulo se forme.
2. Preparar y etiquetar los crioviales para el almacenaje del suero.
3. Centrifugar los tubos de sangre (sin anticoagulante) a 1600 gravedades durante 10 minutos. Este paso reduce la contaminación con plaquetas. La fracción superior o sobrenadante de aspecto claro, transparente y de un color amarillento corresponde al suero sanguíneo.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	OBTENCION DE MUESTRAS PARA ENSAYOS SEROLOGICOS	POE-001-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	9	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

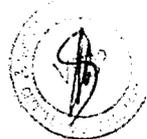
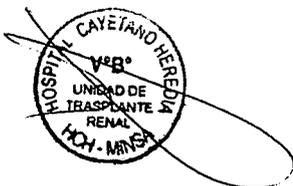
4. Cuidadosamente aspirar el sobrenadante y alícuotar 0.5 mL de suero sanguíneo (fase superior) en los crioviales previamente etiquetados. Este fraccionamiento de la muestra evita las congelaciones y descongelaciones sucesivas las cuales conllevan a la desnaturalización de las proteínas.
5. Almacenar los crioviales en las cajas para crio almacenaje y guardarlas a -20°C o -80°C. Si la muestra va a ser utilizada a corto plazo puede conservarse a 4°C.
6. Registrar la ubicación de la muestra en el mapa y/o formato respectivo.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular, el personal que trabajen en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular, deberá leer obligatoriamente este POE.

REFERENCIA

1. 2012 Best Practice for Repositories. Collection, Storage, Retrieval and Distribution of Biological Materials for Research. International Society for Biological and Environmental Repositories. Third Edition.
2. Vaught, Jimmie B. Blood Collection, Shipment, Processing and Storage. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006; 15 (9). September 2006.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	EXTRACCION DE ADNg HUMANO A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA	POE-002-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	10	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Determinar el procedimiento a seguir por el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM) para la obtención de ADN humano proveniente de muestras de sangre.

ALCANCE

Aplica para muestras de pacientes ambulatorios, particulares, hospitalizados y de emergencia que acuden al Hospital Cayetano Heredia (HCH) y requieran análisis por pruebas moleculares posteriores.

RESPONSABILIDAD

Biólogo Molecular

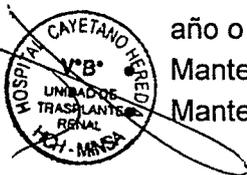
DEFINICIONES

- **PureLink® Genomic DNA Kits.**

Este kit está basado en la unión selectiva del ADN genómico (ADNg) desnudo a una membrana de sílica gel en presencia de sales caotrópicas. El material biológico es digerido con proteinasa K a 55°C empleando un buffer de digestión que contiene detergente el cual disuelve las membranas de las células, permitiendo que la proteinasa K digiera las proteínas que empaquetan el ADN, dejándolo desnudo. El ARN residual es removido por digestión con RNAsa antes de la unión de los ácidos nucleicos a la membrana de sílica gel. El lisado es mezclado con etanol y un buffer de unión que permite que el ADN se una a la membrana de sílica gel presente en las mini columnas, las impurezas presentes son retiradas con un buffer de lavado. Finalmente el ADNg es liberado de la membrana con un buffer de elución bajo en sales. Este kit está diseñado para extraer de manera eficiente ADNg de células y tejidos de mamífero, muestras de sangre, hisopado bucal, bacterias, levaduras, tejidos fijados en formalina y embebidos con parafina. El ADN es purificado a partir del lisado el cual es filtrado en mini columnas por medio de centrifugación. El tamaño de ADN que se puede extraer como mínimo oscila entre 20 y 50 Kb de longitud por lo cual puede ser usado en pruebas moleculares posteriores como PCR, secuenciamiento de ácidos nucleicos, digestión con enzimas de restricción y ensayos de hibridación.

CONDICIONES GENERALES

- La muestra de sangre humana puede ser fresca o congelada, colectada con anticoagulante Citrato de Sodio o EDTA.
 - Almacenar los reactivos a temperatura ambiente. La solución de proteinasa K y RNAsa son estables a temperatura ambiente por un año. Para un almacenamiento mayor a 1 año o cuando la temperatura ambiental es mayor a 25°C, mantenerlas a 4°C.
- Mantener el ambiente de extracción estéril para evitar contaminación con ADNasas.
Mantener el equipo a ser usado (micropipetas) libres de DNAsas.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	EXTRACCION DE ADNg HUMANO A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA	POE-002-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	11	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- La muestra no debe ser mezclada en vortex por más de 10 segundos para evitar demasiado fraccionamiento del ADN.
- Verificar que no exista precipitado en los buffers a ser empleados. De ser así, calentarlos a 37°C durante 3 a 5 minutos para disolver el precipitado.
- Para minimizar la degradación del ADN, la preparación del lisado debe realizarse rápidamente.
- Para obtener una mayor cantidad y calidad de ADN proceder a la extracción y almacenamiento del mismo tan pronto como la muestra sea colectada.
- En el caso de muestras de sangre que lleguen de fuera de las instalaciones del HCH, solo se aceptaran muestras frescas debidamente rotuladas y guardando la cadena de frío. El frasco debe estar totalmente sellado herméticamente.
- Método a utilizar es de Biología Molecular.

MATERIALES

- Etanol 96-100%
- Tubos de micro centrífuga libres de DNAsa.
- Guantes y depósito para descarte.

EQUIPOS

- Micropipetas y puntas (20, 100, 200 y 1000 uL) estériles.
- Micro centrífuga para micro tubos de 2 mL.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

- Verificar la Información del paciente, siempre manteniendo la privacidad de este, y asegurar la correcta relación de los tubos de extracción sanguínea debidamente etiquetados con la información del paciente.
- Extraer sangre recogiendo en el tubo de extracción sanguínea (sin anticoagulante) previamente Identificado.
- Inmediatamente tras la extracción invertir suavemente el tubo para favorecer la coagulación.
- Transportar la muestra al laboratorio para su procesamiento en un tiempo no mayor a 1 hora después de la extracción, manteniendo las pautas de seguridad para el transporte de material biológico.

REACTIVOS

- PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer, incluido en el Kit.
- PureLink Genomic Digestión Buffer, incluido en el Kit.
- Proteinasa K (20 mg/mL), incluido en el Kit.
- RNAsa A (20 mg/mL), incluido en el Kit.
- Wash Buffer 1 y 2, incluido en el Kit.

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	EXTRACCION DE ADNg HUMANO A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA	POE-002-02	REVISADO	Centeno Diaz, A
	PÁG.	12	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

Los buffers de lavado 1 y 2 deben ser preparados antes de su uso adicionando etanol al 96-100% según se indica en el envase respectivo. Se debe registrar en la botella que el reactivo ya está listo para ser usado.

CALIBRACION.

El método de aislamiento es manual.

CONTROL DE CALIDAD

Luego de la extracción del ADNg este debe tener una buena calidad libre de contaminantes, para ello el ratio A260/A280 debe ser >1.80, será un indicativo que la pureza obtenida es apropiada para ensayos posteriores.

PROCEDIMIENTO

LISIS

1. Llevar el bloque térmico a 55°C.
2. Colocar un mínimo de 200 uL de la muestra sanguínea en un tubo de micro centrifuga estéril. Si el volumen es menor completar adicionando Buffer Fosfato Salino.
3. Adicionar 20 uL de Proteinasa K luego 20 uL de RNAsa, mezclar bien y dejar incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Adicionar 200 uL de PureLink Genomic Lysis / Binding Buffer, vortex hasta obtener una solución homogénea.
5. Incubar a 55°C por 30 minutos para permitir la digestión de las proteínas.
6. Adicionar 200 uL de etanol 96-100 %, mezclar en vortex hasta quedar homogéneo y sin coágulos (si está muy denso aun la muestra esto obstruirá el filtro, añadir otros 200 uL de etanol 96-100%.

AISLAMIENTO

1. Adicionar 640 uL del lisado obtenido en una mini columna.
2. Centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Descartar el tubo de colección (que contiene el líquido que paso por la mini columna) y colocar un nuevo tubo de colección para los lavados siguientes.

LAVADO

1. Adicionar 500 uL de wash buffer 1, previamente diluido en etanol 96-100%.
2. Centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Descartar el tubo de colección (que contiene el líquido que paso por la mini columna) y colocar la mini columna en un nuevo tubo de colección estéril.
4. Adicionar 500 uL de wash buffer 2, previamente diluido en etanol 96-100%. Centrifugar a 8,000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Descartar el tubo de colección.

OBTENCION DE ADNg

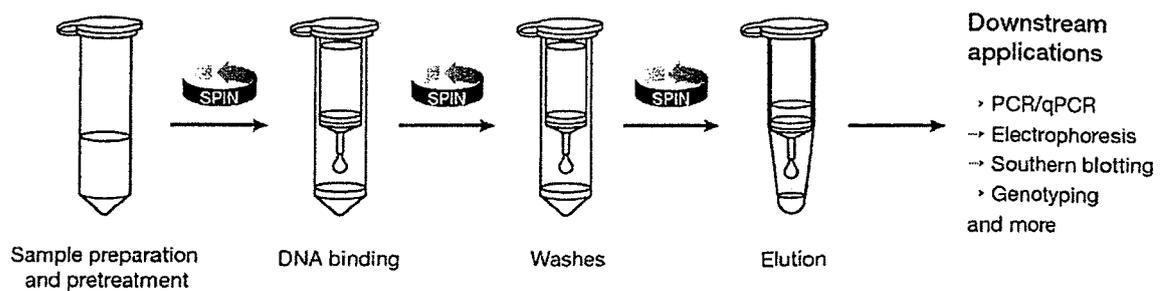
1. Colocar la mini columna en un tubo de micro centrifuga estéril de 1.5 mL.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	EXTRACCION DE ADNg HUMANO A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA	POE-002-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG	13	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Adicionar 100 uL de PureLink™ Genomic Elution Buffer. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
- Centrifugar a 10,000 rpm por 1.5 minutos a temperatura ambiente, primera elución.
- Para la segunda elución, colocar 100 uL de buffer de elución y centrifugar a 10,000 rpm por 3 minutos.
- El tubo de colección, ahora, contiene ADN puro.
- Almacenar el ADN obtenido a -20°C.



ALMACENAMIENTO

El ADN obtenido es cuantificado y almacenado para ensayos posteriores. La temperatura para almacenamiento a largo plazo es -20°C, el ADN que será usado inmediatamente puede ser mantenido a 4 °C.

Para evitar descongelar la misma muestra repetidamente se preparan alícuotas.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular, el personal que trabajen en el LHBM, deberá leer obligatoriamente este POE. Así mismo el manejo de este proceso se requiere de personal con experiencia, bajo la supervisión del personal encargado.

REFERENCIA

- Purelink® Genomic DNA Kits. Invitrogen User Manual.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182002>



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	CUANTIFICACION DE ADNg MEDIANTE FLUOROMETRIA	POE-003-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	14	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Determinar el procedimiento a seguir por el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM) en la cuantificación de ADN Humano empleando un equipo de fluorescencia Qubit® Fluorometer Invitrogen.

ALCANCE

Aplica a las muestras biológicas cuyo ADN es extraído. Las muestras provienen de pacientes ambulatorios, particulares, hospitalizados y de emergencia que acuden al Hospital Cayetano Heredia (HCH) y requieran pruebas moleculares posteriores.

RESPONSABILIDAD

Biólogo Molecular

DEFINICIONES

- **Absorbancia:** es la cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra.
- **ADN:** Siglas de Acido Desoxirribonucleico, molécula biológica de doble cadena que contiene toda la información genética de un ser vivo, información que es única e irrepetible en el ser humano. Conformado por Adenina, Citocina, Guanina y Timina.
- **Cuantificación de ADN:** Uno de los métodos más utilizados para la cuantificación del ADN es el análisis de la absorción UV, ya que los nucleótidos poseen máximos de absorción alrededor de 260 nm. Este método proporciona una estimación simple y precisa de la concentración de una muestra, pero sólo si ésta se encuentra pura, sin contaminación significativa de proteínas o solventes orgánicos que absorben a longitudes de onda cercanas. Para evaluar la pureza de la muestra debe determinarse la proporción OD 260nm/OD 280nm. Si la relación es mayor a 1,8 puede estimarse que la muestra de ADN es lo bastante pura para posteriores análisis. En tanto que un valor de 2.0 es aceptado como puro para ARN.

CONDICIONES GENERALES

- El ensayo requiere una temperatura entre 22°C y 28°C, cualquier variación fuera de este rango puede influir en la exactitud de la medición.
- Mantener los reactivos a temperatura ambiente y NO dejarlos en el instrumento por un tiempo mayor al que se necesita para hacer la medición.
- Luego de mezclar la muestra o la solución estándar, estas deben dejarse incubar por unos dos minutos antes de hacer las mediciones. Luego de este periodo de incubación la señal de fluorescencia es estable hasta por tres horas a temperatura ambiente.
- Los reactivos empleados presentan alta foto estabilidad, mostrando una reducción menor al 0.3% de fluorescencia luego de 9 lecturas y una reducción de solo 2.5% luego de 40 lecturas.
- Método a utilizar es de Biología Celular.

MATERIALES

- Tubos tipo eppendorf delgados de 0.5 mL



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	CUANTIFICACION DE ADNg MEDIANTE FLUOROMETRIA	POE-003-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	15	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Gradilla para tubos
- Micropipetas y puntas estériles.
- guantes

EQUIPOS

- Equipo Qubit® Fluorometer Invitrogen.

REACTIVOS

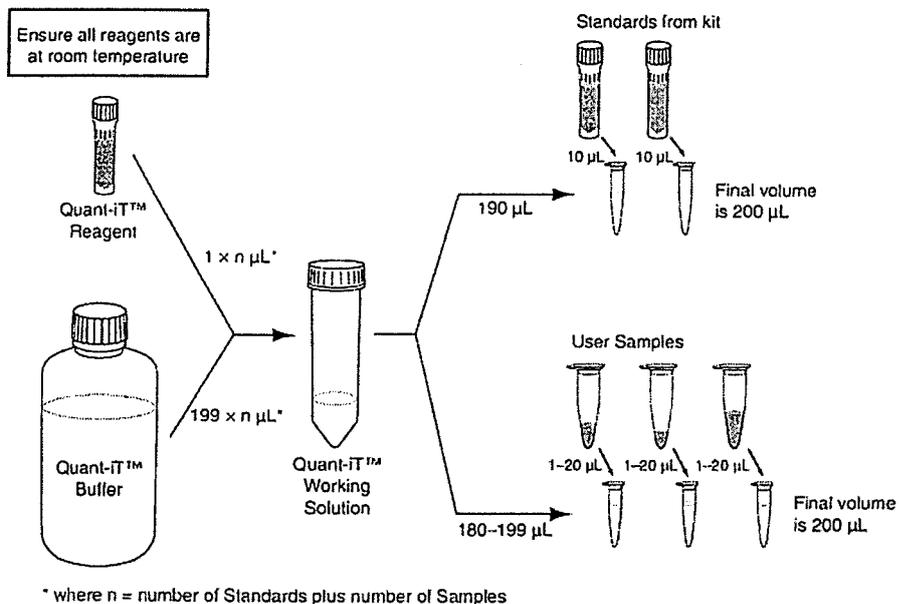
- ds DNA BR Reagent
- ds DNA BR Buffer
- Controles de ADN para curva estándar.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

La muestra corresponde al ADNg extraído de muestra biológica Humana (ver POE-002).

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

- Preparar la solución de trabajo teniendo en cuenta el número de muestras a cuantificar más los 2 controles. Estos 2 volúmenes adicionales corresponden a las soluciones estándar. La solución de trabajo se obtiene mezclando el dsDNA Reagent y el dsDNA Buffer.
- Colocar en un tubo de 0.5 mL, 10 uL de la solución estándar y agregar 190 uL de la solución de trabajo. Preparar solución estándar N°1 y N°2,
- En el caso de la muestra (ADNg extraído) colocar en un tubo de 0.5 mL, 3uL de muestra y agregar 197 uL de la solución estándar.

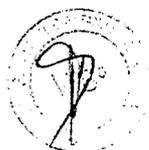


invitrogen

Vortex all assay tubes for 2-3 seconds

Incubate at room temperature for 2 minutes (15 minutes for Quant-iT™ protein assay)

Read tubes in Qubit™ fluorometer



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	CUANTIFICACION DE ADNg MEDIANTE FLUOROMETRIA	POE-003-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	16	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

CALIBRACION DEL EQUIPO.

- En la pantalla "HOME", usar las flechas indicadoras para seleccionar el ensayo, presionar "GO".
- Seleccionar "Run New Calibration", presionar "GO".
- Colocar el tubo con el estándar N°1, presionar "GO". La lectura tomara 5 segundos.
- Colocar el tubo con el estándar N°2, presionar "GO". El valor del estándar N°2 es mayor que el del estándar N°1, el valor de la muestra estará en un punto entre ambos extremos.

CONTROL DE CALIDAD

Para que la medición del ADN no se vea afectada es necesario que la temperatura ambiental no se encuentre fuera del rango requerido por el equipo.

PROCEDIMIENTO

1. Luego de la calibración colocar los tubos con las muestras. La lectura tomara 5 segundos, el valor que aparece en pantalla es la concentración de ácidos nucleicos en el tubo.
2. Grabar la lectura.
3. Retirar el tubo con la muestra, colocar un nuevo tubo y presionar "GO". Repetir el procedimiento tantas veces como lecturas sean requeridas.

REPORTE DE RESULTADOS

1. Terminadas las lecturas para calcular la concentración de la muestra, antes de ser diluida en la solución de trabajo, se aplica la siguiente fórmula:

Concentración de la muestra: $QF \times (200/X)$

Dónde:

QF: es el valor dado por el fluorómetro.

X: es el número de uL de muestra (3 uL) agregada a la solución de trabajo.

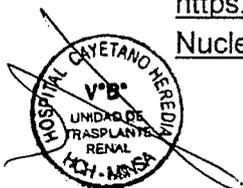
Las unidades serán las mismas que da el Qubit Fluorometer, ug/mL o ng/uL.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular, el personal que trabajen en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal, deberá leer obligatoriamente este POE.

REFERENCIA

1. Abbreviated Protocol Qubit® fluorometer. Invitrogen.
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/cell-tissue-analysis/qubit-all-file-types.par.90790.file.dat/qubit1.0-protocol.pdf>
2. Assessment of Nucleic Acid Purity. Brian Matlock, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, MA, USA.
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	AISLAMIENTO DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA POR GRADIENTE	POE-004-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	17	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Determinar el procedimiento a seguir por el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM) en el procesamiento de muestras clínicas para obtener Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) con Ficol Hypaque.

ALCANCE

Inicia desde la recepción de la muestra con anticoagulante hasta la emisión del resultado. Aplica para muestras de pacientes ambulatorios, particulares, hospitalizados y de emergencia que acuden al Hospital Cayetano Heredia (HCH) y requieran análisis de prueba cruzada para histocompatibilidad o pruebas que requieran CMSP.

RESPONSABILIDAD

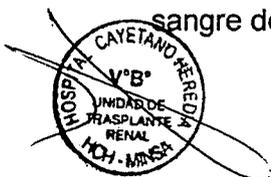
Biólogo Molecular

DEFINICIONES

- **CMSP:** Corresponde a las Células Mononucleares de Sangre Periférica que son células de un único núcleo redondo, característico de los linfocitos y los monocitos. Ambas células son importantes en la respuesta inmune de una persona frente a agentes extraños, estos agentes extraños pueden ser desde un compuesto químico, hasta células y/o tejidos. Estas células se usan en el tamizaje de las pruebas de Histocompatibilidad en el donante-receptor.
- **FICOLL HIPAQUE:** El Ficoll es un polímero de poli-sucrosa que crea un gradiente de densidades con otras soluciones acuosas. El diatrizoato de sodio (Hypaque) es una sustancia yodada que aumenta la densidad del mismo. La mezcla de ambos debe tener una densidad de 1.077 g/mL, lo que hace que los granulocitos y los hematíes que tienen mayor densidad, sean desplazados al fondo del tubo después de una centrifugación. Las plaquetas de menor peso molecular flotarán en el plasma y las células mononucleares se localizarán en la interface formando un anillo.
- **PRUEBA CRUZADA:** Prueba de compatibilidad Donante-Receptor, para trasplante de órganos sólidos. Esta prueba consiste en el enfrentamiento de los anticuerpos presentes en el componente sanguíneo del receptor, con las CMSP de los candidatos a Donantes, en placas de Terasaki. Esta prueba requiere el uso de Complemento de conejo y un colorante vital fluorescente. Una prueba Negativa esta descrita por la incorporación del colorante fluorescente en el 100% de las células. A medida que se pierde la fluorescencia, mayor grado de incompatibilidad entre donante-receptor.

CONDICIONES GENERALES

- Las muestras de sangre humana, deben obtenerse en tubos al vacío que contenga como anticoagulantes Ácido Cítrico - Dextrosa (ACD) o EDTA. NO heparina.
- Volumen de muestra humana total: Entre 9,5 a 12 mL.
- Tanto la sangre como el Ficoll Hypaque (o su equivalente) debe manejarse en condiciones de total esterilidad, por lo que se sugiere el uso de una cabina de flujo laminar.
- Para obtener una óptima cantidad de células y una alta viabilidad, se sugiere usar sangre de no más de 24 horas de obtenida del paciente.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	AISLAMIENTO DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA POR GRADIENTE	POE-004-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	18	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- En el caso de muestras de sangre que lleguen de fuera de las instalaciones del HCH, solo se aceptaran muestras frescas debidamente rotuladas y guardando la cadena de frio. El frasco debe estar totalmente sellado herméticamente.
- Método a utilizar es de Biología Celular.

MATERIALES

- Tubos al vacío con ACD o EDTA.
- Tubos de polietileno de 15 mL.
- Pipetas Pasteur
- Centrifuga
- Contador de células.
- Cámara de Neubauer.
- Micropipetas y puntas estériles.
- Guantes

EQUIPOS

- Cabina de Flujo Laminar
- Centrifuga de tubos de 15 mL.
- Microscopio de luz invertida.

REACTIVOS

- Solución Ficol-Hypaque (1.077)
- Solución de Hanks.
- Medio de cultivo RPM11640.
- Buffer Fosfato Salino pH 7,4 estéril (PBS)
- Colorante vital, azul de tripán.
- Colorante de Inmunofluorescencia, Stain Fix.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

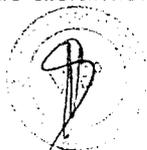
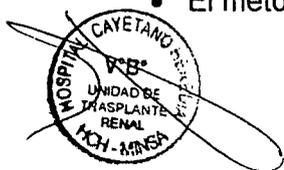
- La muestra sanguínea es obtenida por venopunción en un tubo al vacío con ACD, se puede tomar la muestra con EDTA, como método alterno.
- Para todos los casos NO USAR heparina.
- El procesamiento de la muestra se debe hacer dentro de las 24 horas de obtenida la muestra.

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

- Para todos los casos que se use Ficoll Hypaque en forma directa, se debe diluir y homogenizar la sangre venosa obtenida con una solución de RPMI-1640 1X estéril en proporción 1:1.

CALIBRACION DEL EQUIPO.

- El método de aislamiento es manual.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	AISLAMIENTO DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA POR GRADIENTE	POE-004-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	19	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

CONTROL DE CALIDAD

Se verificará que el Ficoll Hypaque sea expuesto solo en condiciones de esterilidad, para evitar la contaminación de las células aisladas. Un aspecto turbio es indicativo del deterioro del producto. Verificación de fecha de caducidad.

Las Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) serán contadas en una cámara de Neubauer y se calculara la viabilidad celular.

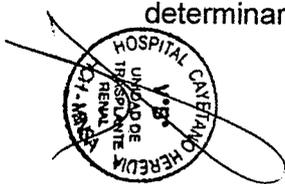
Porcentaje de viabilidad menores a 90%, NO serán tomados en cuenta para la realización de las pruebas de histocompatibilidad u otras pruebas de biología celular.

LIMITACIONES

- El uso de Heparina como anticoagulante, Invalida la extracción, sea cual sea su resultado.
- EL Ficoll requiere refrigeración (2-8 °C) y protección de la luz. Verificar la etiqueta del reactivo indica la fecha de caducidad.
- En el caso de las muestras de sangre que han sido traídas fuera del HNCH, el ensayo se limita al buen manejo del envío de muestra.

PROCEDIMIENTO

1. El aislamiento de CMSP a partir de sangre periférica por el método de gradientes de densidades descrito en este instructivo y en condiciones de esterilidad:
2. Tomar en un tubo cónico de 15 mL, un volumen de sangre con anticoagulante y diluir con un volumen de RPMI-1640. Homogenizar suavemente por Inversión, (Ej., 4 mL sangre con 4 mL de RPMI)
3. En otro tubo cónico de 15 mL colocar 4 mL de Ficoll Hypaque.
4. Trasvasar suavemente la sangre diluida con RPMI sobre el tubo que contiene el Ficoll Hypaque. Inclinar en 45° el tubo con Ficoll y colocarla sangre diluida por las paredes del tubo (Evitar mezclar).
5. Centrifugar durante 30 minutos a 700 gravedades (G) a temperatura ambiente (18-26°C).
6. Después de la centrifugación, tomar una pipeta Pasteur y recuperar el anillo de PBMCs formado en la zona de transición entre el plasma y el Ficoll. Colocar las células aisladas en otro tubo que contenga 2 mL de solución de Hanks, luego completar a 10 mL.
7. Centrifugar 10 minutos a 200xG a temperatura ambiente.
8. Decantar el sobrenadante, agregar al sedimento celular 2 mL de solución de Hanks y resuspenderlo con una pipeta Pasteur (Lavar). Luego completar a 10 mL.
9. Centrifugar 10 minutos a 200xG a temperatura ambiente.
10. Decantar el sobrenadante, resuspender el paquete celular con medio RPMI-1640 en condiciones de esterilidad. De realizarse cultivos suplementar con suero bovino fetal al 5%.
11. Contar las células en la cámara de Neubauer, ajustar a 1 o 2 x 10E6 células/mL y determinar la viabilidad celular.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	AISLAMIENTO DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA POR GRADIENTE	POE-004-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	20	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

REPORTE DE RESULTADOS

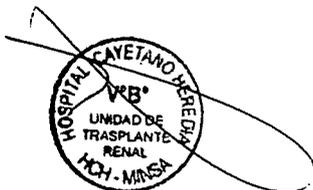
Una vez concluida el aislamiento, determinar el porcentaje de viabilidad celular. Solo se consideran aptos para trabajo, los aislamientos con más del 90% de CMSP viables o vivas.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular, el personal que trabajen en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal, deberá leer obligatoriamente este POE.

REFERENCIA

1. English D, Andersen BR: Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. J Immunol Methods 1974, 5:249.
2. Bóyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. (Paper IV). Scand J Clin Lab Invest 1968, 21 Suppi, 97: 77-89.
3. Hokland, P. and I. Heron. Analysis of the lymphocyte distribution during isopaque-ficoll isolation of mononuclear cells from human peropheral blood. J. Immunol. Methods 1980, 32:31
4. Kaplan, J., et al., J. Immunol. Altered lymphocyte markers and blastogenic responses associated with 24-hour delay in processing of blood samples. Methods 1982, 50(2): 187.
5. Ferrante A., Thong Y.H. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the hypaque-ficoll method. Journal of Immunological Methods, 27 August 1980; 36(2):109-117.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T Y B, CON PERLAS INMUNO-MAGNETICAS	POE-005-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	21	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Determinar el procedimiento a seguir por el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM) en el procesamiento de muestras clínicas para obtener Linfocitos T y Linfocitos B humanos a partir de Sangre Periférica para pruebas de Cross Match o Prueba Cruzada para HLA-I y HLA-II tanto en receptores, como donantes vivos o cadavéricos.

ALCANCE

inicia desde la recepción de la muestra con anticoagulante hasta la emisión del resultado. Aplica para muestras de pacientes ambulatorios, particulares, hospitalizados y de emergencia que acuden al Hospital Cayetano Heredia (HCH) y requieran análisis de prueba cruzada para histocompatibilidad o pruebas que requieran CMSP.

RESPONSABILIDAD

Biólogo Molecular

DEFINICIONES

- **PRUEBA CRUZADA:** Prueba de compatibilidad Donante-Receptor, para trasplante de órganos sólidos. Esta prueba consiste en el enfrentamiento de los anticuerpos presentes en el componente sanguíneo del receptor, con las CMSP de los candidatos a Donantes, en placas de Terasaki. Esta prueba requiere el uso de Complemento de conejo y un colorante vital fluorescente. Una prueba Negativa esta descrita por la incorporación del colorante fluorescente en el 100% de las células. A medida que se pierde la fluorescencia, mayor grado de incompatibilidad entre donante-receptor.
- **HLA:** Molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad responsable de la actividad Inmunológica de aceptación o rechazo de tejidos. Se puede encontrar en tejidos como HLA-I o HLA- II. Molécula importante en la Inmunología del Trasplante.
- **LT:** Siglas de Linfocito T (LT). Célula del Sistema Inmune responsable de la respuesta celular frente a los antígenos no propios. Las estirpes celulares más importantes son el LT helper (LT CD4+) y el LT citotóxico (LT CD8+), siendo este último el más importante para una prueba cruzada. Presenta HLA-I y está asociado al rechazo celular en trasplante.
- **LB:** Siglas de Linfocito B. Célula del Sistema Inmune responsable de la respuesta humoral sistémica y con capacidad presentadora de antígeno. Presenta tanto HLA-I como HLA-II y está asociado al Rechazo humoral en trasplante.

CONDICIONES GENERALES

- Las muestras de sangre humana, deben obtenerse en tubos al vacío que contenga como anticoagulantes Ácido Cítrico - Dextrosa (ACD) o EDTA. NO heparina.
- Volumen de muestra humana total: Entre 7 a 10 mL.
- Tanto la sangre como las perlas Inmuno-magnéticas deben estar atemperadas, al menos 30 minutos antes del ensayo.
- Las muestras de sangre deben ser lo más frescas posible, preferiblemente de no más 24 horas para tubos con EDTA o más de 4 días para muestras con ACD.
- Las muestras de sangre de pacientes urémicos o leucémicos deben procesarse en un plazo de 24 horas desde la colecta de sangre.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T Y B, CON PERLAS INMUNO-MAGNETICAS	POE-005-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	22	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- En el caso de muestras de sangre que lleguen de fuera de las instalaciones del HNCH, solo se aceptaran muestras del día, debidamente rotuladas y guardando la cadena de frio. El frasco debe estar herméticamente sellado.
- Método a utilizar es de Biología Celular.

MATERIALES

- Tubos al vacío con ACD o EDTA.
- Tubos de polietileno de 15 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Magneto.
- Contador de células.
- Cámara de Neubauer.
- Micropipetas y tips estériles.
- Placas de Terasaki.

EQUIPOS

- Cabina de Flujo Laminar.
- Centrifuga de tubos de 15 mL.
- Microscopio de luz Invertida.
- Refrigeradora.
- Vortex.

REACTIVOS

- Perlas Inmunomagnéticas para HLA clase I.
- Perlas Inmunomagnéticas para HLA clase II.
- Medio de cultivo RPM11640.
- Buffer Fosfato Salino pH 7,4 estéril (PBS)
- Colorante vital, azul de tripán.
- Colorante de Inmunofluorescencia, Stain Fix.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

- La muestra sanguínea es obtenida por venopunción en un tubo al vacío con ACD, se puede tomar la muestra con EDTA, como método alterno.
- Para todos los casos NO USAR heparina.

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

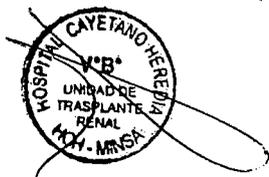
No Aplica.

CALIBRACION DEL EQUIPO.

- El método de aislamiento es manual.

CONTROL DE CALIDAD

Se verificará que las perlas inmuno-magnéticas se mantengan en refrigeración.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T Y B, CON PERLAS INMUNO-MAGNETICAS	POE-005-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	23	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

Se verificará la fecha de caducidad de los productos.

Los Linfocitos T y B aislados serán contados en una cámara de Neubauer y se calculará la viabilidad celular.

Porcentaje de viabilidad menores a 90%, NO serán tomados en cuenta para la realización de las pruebas de histocompatibilidad u otras pruebas de biología celular.

LIMITACIONES

- El uso de Heparina como anticoagulante, invalida la extracción, sea cual sea su resultado.
- Las perlas inmuno-magnéticas requieren refrigeración (2-8°C) para ser viables en las fechas de caducidad del producto.
- En el caso de las muestras de sangre que han sido traídas fuera del HCH, el ensayo se limita al buen manejo del envío de muestra.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento se puede hacer en una mesa previamente descontaminada con Hipoclorito de Sodio al 0.5% final y alcohol al 70% a temperatura ambiente, a menos que el protocolo indique algún cambio en la temperatura de manipulación:

1. Recoja 5 mL de sangre (EDTA o ACD) en un tubo al vacío, enfriar en una refrigeradora de 2°C a 8°C.
2. Rotular los tubos con la denominación HLA-I para el tubo de donde se aislarán Linfocitos T-CD8 y HLA-II para el tubo de donde se aislarán Linfocitos B.
3. Añada 5 mL de PBS frío con citrato de sodio al 0.6 % a cada muestra.
4. Resuspender las perlas magnéticas por agitación en vórtex durante 30 a 60 segundos o incline y gire durante 5 minutos.
5. Añadir 100 uL de perlas magnéticas resuspendidas a la muestra de sangre. (Sea anti HLA-I o anti HLA-II según sea el caso.)
6. Mezcle en agitación durante 5 minutos a una temperatura de 2°C a 8°C.
7. Colocar los tubos con perlas magnéticas en el magneto durante 2 minutos.
8. Deseche el sobrenadante sin perturbar el pellet que contiene las células ligadas a las microesferas.
9. Retire el tubo del magneto y resuspenda las células en 5 mL de PBS helado, pH 7,4, con citrato de sodio al 0.6 %.
10. Colocar los tubos con perlas magnéticas en el magneto durante 2 minutos.
11. Repita los pasos del 8 al 10 cuatro veces; excepto que solo se usará 5 mL de PBS frío, pH 7,4, sin citrato de sodio.
12. Resuspenda las células ligadas a las perlas magnéticas en 0,4 mL de TBSS, pH 7,4, con Ca²⁺, Mg²⁺. Se sugiere adicionalmente FCS al 2 %.
13. Realizar conteo de células viables.

REPORTE DE RESULTADOS

Una vez concluida el aislamiento, determinar el porcentaje de viabilidad celular. Solo se consideran aptos para trabajo, los aislamientos con más del 80% de LT y/o LB vivo.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T Y B, CON PERLAS INMUNO-MAGNETICAS	POE-005-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	24	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular, el personal que trabajen en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal, deberá leer obligatoriamente este POE.

REFERENCIA

1. DYNAL™ Product Inserí for DYNABEADS™ HLA Cell Prep I and II.
2. Hackett Julia A. and Nancy F. Hensel, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), Chapter Serology, pp. 1-A-5, 2000.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T Y B DE GANGLIOS Y BAZO, CON PERLAS MAGNETICAS	POE-006-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	25	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Determinar el procedimiento a seguir por el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM) en el procesamiento de muestras clínicas para obtener Linfocitos T y Linfocitos B humanos a partir de ganglios y bazo para pruebas de CrossMatch o Prueba Cruzada para HLA-I y HLA-II tanto en receptores, como donantes vivos o cadavéricos.

ALCANCE

Inicia desde la recepción de la muestra de tejido en fresco y almacenado en solución salina hasta la recepción en el LHBM. Aplica para muestras de pacientes con muerte cerebral del servicio de emergencia del Hospital Cayetano Heredia (HCH) u otro centro hospitalario, que cuenten con la autorización respectiva, según norma la Oficina Nacional de Trasplante (ONDT).

RESPONSABILIDAD

Biólogo Molecular

DEFINICIONES

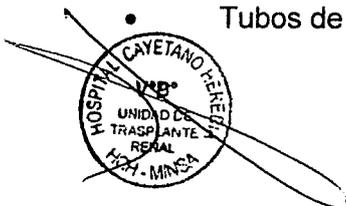
- **PRUEBA CRUZADA:** Prueba de compatibilidad Donante-Receptor, para trasplante de órganos sólidos. Esta prueba consiste en el enfrentamiento de los anticuerpos presentes en el componente sanguíneo del receptor, con las CMSP de los candidatos a Donantes, en placas de Terasaki. Esta prueba requiere el uso de Complemento de conejo y un colorante vital fluorescente. Una prueba Negativa esta descrita por la incorporación del colorante fluorescente en el 100% de las células. A medida que se pierde la fluorescencia, mayor grado de incompatibilidad entre donante-receptor.
- **HLA:** Molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad responsable de la actividad Inmunológica de aceptación o rechazo de tejidos. Se puede encontrar en tejidos como HLA-I o HLA- II. Molécula importante en la Inmunología del Trasplante.
- **LT:** Siglas de Linfocito T (LT). Célula del Sistema Inmune responsable de la respuesta celular frente a los antígenos no propios. Las estirpes celulares más importantes son el LT helper (LT CD4+) y el LT citotóxico (LT CD8+), siendo este último el más importante para una prueba cruzada. Presenta HLA-I y está asociado al rechazo celular en trasplante.
- **LB:** Siglas de Linfocito B. Célula del Sistema Inmune responsable de la respuesta humoral sistémica y con capacidad presentadora de antígeno. Presenta tanto HLA-I como HLA-II y está asociado al Rechazo humoral en trasplante.

CONDICIONES GENERALES

- Las muestras de tejido debe obtenerse en fresco y embebido en solución salina estéril.
- La muestra debe mantenerse refrigerada hasta su entrega en el LHBM.
- Muestras a entregar: Una cuña de Bazo y entre 2 a 3 ganglios linfáticos inguinales.
- Método a utilizar es de Biología Celular.

MATERIALES

- Tubos de polietileno de 15 mL.
- Tubos de microcentrifuga 1.5 mL.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T Y B DE GANGLIOS Y BAZO, CON PERLAS MAGNETICAS	POE-006-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	26	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Pipetas Pasteur.
- Magneto.
- Contador de células.
- Cámara de Neubauer.
- Micropipetas y tips estériles.
- Placas de Terasaki.

EQUIPOS

- Cabina de Flujo Laminar
- Centrifuga de tubos de 15 mL.
- Microscopio de luz Invertida.
- Refrigeradora
- Vortex.

REACTIVOS

- Perlas Inmuno-magnéticas para HLA clase I.
- Perlas Inmuno-magnéticas para HLA clase II.
- Medio de cultivo RPM11640.
- Solución 1X de HBSS.
- Buffer Fosfato Salino pH 7,4 estéril (PBS)
- Colorante vital, azul de tripán.
- Colorante de Inmunofluorescencia, Stain Fix.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

- La muestra de tejidos es obtenido en sala de operaciones y preservado en fresco en Solución Salina 9% y mantener a 4°C.

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

No Aplica.

CALIBRACION DEL EQUIPO.

El método de aislamiento es manual.

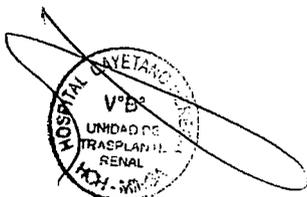
CONTROL DE CALIDAD

Se verificará que las perlas inmunomagnéticas se mantengan en refrigeración.

Se verificará la fecha de caducidad de los productos.

Los Linfocitos T y B aislados serán contadas en una cámara de Neubauer y se calculara la viabilidad celular.

Porcentaje de viabilidad menores a 90%, NO serán tomados en cuenta para la realización de las pruebas de histocompatibilidad u otras pruebas de biología celular.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	ASLAMIENTO DE LINFOCITOS T Y B DE GANGLIOS Y BAZO, CON PERLAS MAGNETICAS	POE-006-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	27	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev..02

LIMITACIONES

- Las perlas inmuno-magnéticas requieren refrigeración (2°C - 8°C) para ser viables en las fechas de caducidad del producto.
- En el caso de las muestras de tejido que han sido traídas fuera del HCH, el ensayo se limita al buen manejo del envío de muestra.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento se puede hacer en una mesa previamente descontaminada con Hipoclorito de Sodio al 0.5% final y alcohol al 70% a temperatura ambiente, a menos que el protocolo indique algún cambio en la temperatura de manipulación:

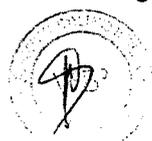
1. Para las muestras de Bazo o Ganglios Linfáticos, se debe inyectar de 5 a 10 mL de RPMI en el caso de Bazo y/o 1 a 2 mL para cada ganglio.
2. Inyectar y aspirar el medio de cultivo de las biopsias para re suspender las células dentro de los tejidos.
3. Recoja las células en un tubo de 15 mL, y enfriar en una refrigeradora de 2°C a 8°C.
4. Rotular los tubos con la denominación HLA-I para el tubo de donde se aislaran Linfocitos T-CD8 y HLA-II para el tubo de donde se aislaran Linfocitos B.
5. Añada 5 mL de PBS fría a cada muestra.
6. Re suspenda las perlas magnéticas por agitación en vórtex durante 30 a 60 segundos o incline y gire durante 5 minutos.
7. Añadir 100 uL de perlas magnéticas re suspendidas a la solución de RPMI con células. (Sea anti HLA-I o anti HLA-II según sea el caso.)
8. Mezcle en agitación durante 5 minutos a una temperatura de 2°C a 8°C.
9. Colocar los tubos con perlas magnéticas en el magneto durante 2 minutos.
10. Deseche el sobrenadante sin perturbar el pellet que contiene las células ligadas a las microesferas.
11. Retire el tubo del magneto y re suspenda las células en 5 mL de PBS helado, pH 7,4.
12. Colocar los tubos con perlas magnéticas en el magneto durante 2 minutos.
13. Repita los pasos del 8 al 10 cuatro veces; excepto que solo se usará 5 mL de PBS fría, pH 7,4.
14. Resuspenda las células ligadas a las perlas magnéticas en 0,2 mL de HBSS, pH 7,4, con Ca²⁺, Mg²⁺. Se sugiere adicionalmente FCS al 2 %.
15. Realizar conteo de células viables.

REPORTE DE RESULTADOS

Una vez concluida el aislamiento, determinar el porcentaje de viabilidad celular. Solo se consideran aptos para trabajo, los aislamientos con más del 80% de LT y/o LB vivos.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular, el personal que trabajen en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal, deberá leer obligatoriamente este POE.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T Y B DE GANGLIOS Y BAZO, CON PERLAS MAGNETICAS	POE-006-02	REVISADO	Centeno Diaz, A
	PÁG.	28	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

REFERENCIA

1. DYNAL™ Product Insert for DYNABEADS™ HLA Cell Prep II and I.
2. Hackett Julia A. and Nancy F. Hensel; American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), Chapter Serology, pp. 1-A-5, 2000.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	PRUEBA DE REACCION CRUZADA O CROSS-MATCH ESTANDARD	POE-007-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	29	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Estandarizar el procedimiento a seguir por el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM) en la realización de Pruebas Cruzadas (CrossMatch) estándar entre receptor y receptor vivo-relacionado y/o cadavérico, para determinar la presencia de anticuerpos preformados contra los antígenos HLA del donante.

ALCANCE

Metodología en la que los Linfocitos T y/o B obtenidos de sangre periférica (donantes vivo relacionado o cadavérico) o de tejidos (donante cadavérico) se enfrentan con suero sanguíneo del Receptor. Estos anticuerpos pueden corresponder a estímulos inmunológicos tales como: transfusiones, embarazos, o trasplantes previos, y son importantes para determinar posibles efectos citotóxicos, que provocan el rechazo hiperagudo en trasplante.

RESPONSABILIDAD

Biólogo Molecular

DEFINICIONES

- **PRUEBA CRUZADA:** Prueba de compatibilidad Donante-Receptor, para trasplante de órganos sólidos. Esta prueba consiste en el enfrentamiento de los anticuerpos presentes en el componente sanguíneo del receptor, con las CMSP de los candidatos a Donantes, en placas de Terasaki. Esta prueba requiere el uso de Complemento de conejo y un colorante vital fluorescente. Una prueba Negativa esta descrita por la incorporación del colorante fluorescente en el 100% de las células. A medida que se pierde la fluorescencia, mayor grado de incompatibilidad entre donante-receptor.
- **HLA:** Molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad responsable de la actividad Inmunológica de aceptación o rechazo de tejidos. Se puede encontrar en tejidos como HLA-I o HLA- II. Molécula importante en la Inmunología del Trasplante.
- **LT:** Siglas de Linfocito T (LT). Célula del Sistema Inmune responsable de la respuesta celular frente a los antígenos no propios. Las estirpes celulares más importantes son el LT helper (LT CD4+) y el LT citotóxico (LT CD8+), siendo este último el más importante para una prueba cruzada. Presenta HLA-I y está asociado al rechazo celular en trasplante.
- **LB:** Siglas de Linfocito B. Célula del Sistema Inmune responsable de la respuesta humoral sistémica y con capacidad presentadora de antígeno. Presenta tanto HLA-I como HLA-II y está asociado al Rechazo humoral en trasplante.

CONDICIONES GENERALES

- Los sueros de receptores, no deberán tener una antigüedad mayor a 4 meses y conservadas a - 20°C.
- Tanto la sangre como las perlas inmunomagnéticas deben estar atemperadas, al menos 30 minutos antes del ensayo.
- En el caso de muestras de sangre que lleguen de fuera de las instalaciones del HNCH, solo se aceptaran muestras del día, debidamente rotuladas y guardando la cadena de frio.
- Método a utilizar es de Biología Celular.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	PRUEBA DE REACCION CRUZADA O CROSS-MATCH ESTANDARD	POE-007-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	30	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

MATERIALES

- Tubos de polietileno de 15 mL.
- Tubos de microcentrifuga 1.5 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Magneto.
- Contador de células.
- Cámara de Neubauer.
- Micropipetas y tips estériles.
- Placas de Terasaki.

EQUIPOS

- Microscopio de luz invertida con Fluorescencia.
- Microcentrifuga de tubos de 2 mL.
- Microjeringas tipo Hamilton
- Placas de Terasaki estériles.
- Refrigeradora
- Vortex
-

REACTIVOS

- Complemento de Conejo.
- Buffer Fosfato Salino pH 7,4 estéril (PBS)
- Agua Destilada estéril.
- Solución de Naranja de Acridina/ Bromuro de Etídio.
-

OBTENCIÓN DE MUESTRA

- Las células previamente se obtuvieron en el POE-005, las células son viables por 3 horas, y si se requiere mantenerlos por más tiempo estas deben ser resuspendidos en medio RPMI 1640 con suero fetal bovino al 5-10%, mantener a 4°C.

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

No Aplica.

CALIBRACION DEL EQUIPO.

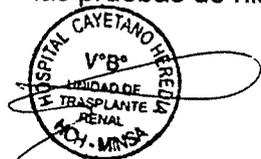
El método de aislamiento es manual.

CONTROL DE CALIDAD

Se verificará que los biológicos se mantengan en refrigeración.

Se verificará la fecha de caducidad de los productos.

Porcentaje de viabilidad menores a 90%, NO serán tomados en cuenta para la realización de las pruebas de histocompatibilidad u otras pruebas de biología celular.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	PRUEBA DE REACCION CRUZADA O CROSS-MATCH ESTANDARD	POE-007-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	31	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

LIMITACIONES

- Para el caso de donantes cadavéricos la viabilidad celular podría ser menor y deberá tenerse mucho cuidado con los controles negativos.
- Como toda prueba celular se deben considerar la conservación adecuada de cada reactivo.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento se puede hacer en una mesa previamente descontaminada con Hipoclorito de Sodio al 0.5% final y alcohol al 70% a temperatura ambiente, a menos que el protocolo indique algún cambio en la temperatura de manipulación:

1. Atemperar los materiales biológicos y reactivos del ensayo, 15 a 30 minutos antes de su uso.
2. Colocar 1 uL de suero de los receptores candidatos en la placa de Terasaki.
3. Dispensar 1 uL de la suspensión celular (LT y/o LB) en cada pocillo. No refluir las células aisladas en la jeringa de dispensación ni agitar con violencia.
4. Incubar durante 30-45 minutos a 20-22°C (temperatura ambiente) en oscuridad.
5. Añadir 3-5 uL de complemento a cada pocillo, (según lo recomendado por el fabricante). El complemento debe ser necesariamente valorado para evitar reacciones inespecíficas con las células aisladas mediante las perlas magnéticas.
6. Incubar durante 30-45 minutos a 20-22°C, (temperatura ambiente) en oscuridad.
7. Añadir 1 uL de solución de Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio (AO/EB).
8. Incubar durante 15 minutos a 20-22°C, (temperatura ambiente) en oscuridad.
9. Leer en un microscopio de fluorescencia invertido dentro de la primera hora.

REPORTE DE RESULTADOS

Una vez concluida el ensayo, determinar si existe reactividad del suero de receptor con los LT y/o LB del donante. Se calificara como:

- **No Reactivo:** De ver las células T o B de color verde fluorescente, en porcentaje igual o mayor que el control negativo.
- **Reactivo:** De encontrar que las Células T o B de color verde fluorescente en porcentaje menor que el control negativo, (células de color rojo). Se indicara resultados como +1, +2, +3 ó +4, según sea el grado de muerte celular.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular, el personal que trabajen en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal, deberá leer obligatoriamente este POE.

REFERENCIA

- DYNAL™ Product Inserí for DYNABEADS™ HLA Cell Prep I and II.
- Hackett Julia A. and Nancy F. Hensel, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), Chapter Serology, pp. 1-A-5, 2000.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TAMIZAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-008-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	32	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Determinar el procedimiento a seguir por el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM) en el tamizaje de Anticuerpos totales IgG Anti HLA humano (tamiz HLA-clase I y clase II) en pacientes candidatos a trasplante de órganos sólidos.

ALCANCE

Inicia desde la preparación de suero o plasma de pacientes con Enfermedad Renal Crónica Terminal (ERCT) a trasplantarse en el Hospital Cayetano Heredia u otra sede hospitalaria que requieran determinar el grado de sensibilización a las moléculas de HLA, que puedan generar un rechazo.

RESPONSABILIDAD

Biólogo Molecular.

DEFINICIONES

- **HLA:** Refiere al Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano, importante para la actividad inmune e importante en el pronóstico para la supervivencia de trasplantes alogénicos.
- **HLA clase I:** Corresponde a los Antígenos Leucocitarios Humanos A, B y/o C.
- **HLA clase II:** Corresponde a los Antígenos Leucocitarios Humanos DR, DQ y/o DP.
- **SENSIBILIZACION:** Producción de anticuerpos Anti-HLA específicos que se pueden adquirir por aloinmunización como resultado de embarazos, transfusiones sanguíneas o trasplantes previos.
- **IgG:** Producto de la Respuesta Humoral. Inmunoglobulina específica monomérica producida en la respuesta inmune secundaria e indicador de cronicidad.
- **PRA:** Panel de Anticuerpos Reactivos que mide el grado de sensibilización a los antígenos de HLA en un panel de antígenos HLA consenso de la región de procedencia del paciente.
- **MFI:** Del acrónimo en inglés "Mean Fluorescent Intensity", es la intensidad media fluorescente luego de la lectura por el fluoroanalizador Luminex®.

CONDICIONES GENERALES

- Los reactivos deben ser mantenidos entre 4 y 8 °C.
- Se debe temperar a temperatura ambiente todos los materiales e insumos, con 10 minutos de anticipación.
- Método a utilizar es de Inmunodiagnóstico.

MATERIALES

- Placas Millipore® Filter Plates.
- Selladores en láminas Costar®, Polietileno "Sealing Tape".
- Tubos de microcentrifuga de 2 y 1.5 mL, para la muestra del paciente y diluciones de controles y reactivos.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TAMIZAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-008-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	33	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Micropipetas ajustables para dispensar 10 -100 uL y 100 - 1,000 uL y puntas desechables.
- Cronómetro.
- Toallitas papel absorbente.

EQUIPOS

- Fluoroanalizador, Luminex®Scan 100/200, Software MATCH IT!® V1.3, para análisis de anticuerpos IMMUCOR®LIFECODES®.
- Centrífuga para separar suero o plasma.
- Microcentrifuga de tubos de 1.5-2 mL.
- Refrigeradora 4°C.
- Congeladora -20°C.
- Hot plate.
- Vortex.
- Bomba de vacío eléctrica Rocker 300.

REACTIVOS

LIFECODES LifeScreen Deluxe (LMX), es un ensayo de tamizaje para determinar la presencia de anticuerpos anti-HLA de Clase I y II. Contiene 5 componentes en cantidad suficiente para 96 ensayos.

- **LMXB Microesferas LifeScreen Deluxe (480 µL):** Mezcla de microesferas, cada una conjugada con glicoproteínas de HLA de clase I o glicoproteínas de HLA de clase II, más cuatro (4) microesferas de control. El tampón de almacenamiento es un tampón de fosfato que contiene NaCl, Tween-20, ProClin300 y seroalbúmina bovina. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga el producto a la luz durante más de tres horas. Listo para su uso. Consérvelo a 2-8°C en la oscuridad.
- **LMCJS Conjugado concentrado (550 µL):** Reserva (10x) de anticuerpos caprinos anti-IgG humano conjugado con ficoeritrina en un tampón fosfato de almacenamiento que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y seroalbúmina bovina.
- **LMWB Tampón de lavado (150 mL):** Tampón fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y seroalbúmina bovina. Listo para su uso. Consérvelo a 2-8°C y equilíbrelo con la temperatura ambiente (20 a 24°C) antes de usarlo.
- **LMPC Suero control positivo (80 µL):** Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se ha demostrado que están aloinmunizados a los antígenos de HLA. Listo para su uso. Consérvelo a 2-8°C.
- **LMNC Suero control negativo (80 µL):** Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se sabe que no tienen ningún anticuerpo contra antígenos HLA. Listo para su uso. Consérvelo a 2-8°C.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

- Las muestras de suero se obtendrán siguiendo el POE-001-02, luego de la toma de muestra el suero puede ser mantenido a 4°C, por 48 horas, o a -20°C, por más de seis meses.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TAMIZAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-008-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	34	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

No Aplica.

CALIBRACION DEL EQUIPO.

Se debe activar el equipo Luminex® por 30 minutos antes de utilizarlo, para que el láser se caliente y se estabilice.

El equipo se calibra cada 120 días, mediante su propio protocolo de Calibración.

CONTROL DE CALIDAD

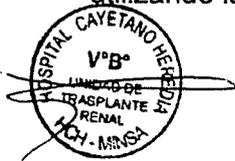
Frecuencia: Con cada nuevo envío. Suero Control positivo y Control negativo del proveedor.

Criterios de aceptación y acciones correctivas:

- El control de calidad del rendimiento del producto está incluido en LIFECODES LifeScreen Deluxe. El producto incluye un suero control positivo y negativo. Estos sueros control deben incluirse con cada prueba que se realice para ayudar a determinar si han ocurrido errores técnicos o fallos de reactivos. El suero control positivo reaccionará tanto con las microesferas conjugadas de HLA de clase I (PROBE I-01) como de clase II (PROBE II-01), dando un mínimo de intensidad media de fluorescencia de 10,000. El suero control negativo será negativo tanto para los anticuerpos anti-HLA de clase I como de clase II. Si estos controles no cumplen con estos criterios, pueden afectar negativamente a su ensayo.
- Asimismo, la mezcla de microesferas incluye tres microesferas de control negativo [CON] y una microesfera de control positivo [Probe 77]. Las microesferas CON miden el ruido de fondo en el ensayo y se utilizan para normalizar la señal de las microesferas de HLA. Estas microesferas deben mostrar bajos valores de MFI. Consulte en la ficha de registro específica del lote los rangos previstos para las microesferas de control negativo. Los datos que no estén dentro de este rango deben examinarse minuciosamente.
- La microesfera de control positiva [Probe 77] se conjuga con el IgG humano e indicará que el conjugado (LMCJS) ha sido agregado a un pocillo de prueba.
- Al realizar una prueba con el suero control, Probe 77 mostrará valores de MFI \geq 10,000. Si obtiene valores de MFI inferiores a 10,000 con los sueros de control, es probable que el lavado haya sido insuficiente o que el conjugado no esté en buenas condiciones.
- Las muestras de los pacientes muestran un amplio rango de reactividad con Probe 77, pero deben producir una señal de MFI $>6,000$. En la ausencia de sueros, Probe 77 producirá una señal intensa, mientras para el resto de las microesferas será aproximadamente de 50 o inferior. Si una muestra genera un patrón similar de valores, quiere decir que es posible que se haya omitido accidentalmente la muestra. Estas muestras deberán volver a analizarse.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Detecta sólo anticuerpos del Tipo IgG pero no IgA o IgM, éstos pueden detectarse utilizando las anti-IgS adecuadas.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TAMIZAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-008-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	35	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Pueden obtenerse resultados erróneos por contaminación bacteriana de los materiales, incubaciones demasiado cortas, lavado o decantado insuficiente de las microesferas, exposición del conjugado a luz parásita u omisión de reactivos o etapas de la prueba.
- La presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobina en la muestra del paciente puede incrementar las uniones inespecíficas y producir resultados erróneos en el análisis.
- En análisis de laboratorio, se demostró que la timoglobulina (Genzima) da resultados positivos falsos, por lo que los resultados pueden ser incorrectos
- Este producto detecta los anticuerpos IgG que pueden o no ser linfocitotóxicos. Los anticuerpos detectados son aquellos reactivos dentro de la población de antígenos disponibles detallados en la hoja de registro.
- Para PROBE I-01, las glicoproteínas de HLA de clase I purificadas por afinidad se obtienen de plaquetas de los siguientes donantes de sangre: 100 individuos de raza blanca, 100 individuos de raza negra y 100 individuos de raza blanca de origen hispanoamericano. Para PROBE II-01, las glicoproteínas de HLA de clase II purificadas por afinidad utilizadas en la fabricación de este producto se derivan de los linfocitos B transformados por el EBV, que representan los siguientes antígenos de HLA de clase II: DR1, DR4, DR7, DR8, DR9, DR10, DR11, DR12, DR13, DR14, DR15, DR16, DR17, DR18, DR103, DR51, DR52 y DR53.
- Los ensayos LIFECODES LifeScreen Deluxe no detectan algunas inmunoglobulinas IgA, IgM de baja avidéz y concentración, ni los anticuerpos frente a alelos poco comunes.
- Debido a la complejidad del análisis de HLA, la interpretación de los datos debería ser revisada por personal cualificado. En la determinación de la especificidad de los anticuerpos con los kits LIFECODES LifeScreen Deluxe deben tenerse en cuenta los resultados de todas las microesferas, incluyendo aquellas iguales o similares al valor límite. Puede ser útil el conocimiento del paciente y la comprensión de los grupos con reactividad cruzada para asignar la especificidad a un suero determinado.

PROCEDIMIENTO

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS y/o REACTIVOS

1. Los sueros pueden ser frescos o congelados. Se recomienda eliminar agregados mediante centrifugación o filtración.
2. Sacar el buffer de lavado para que se atempere antes de usar (20-24°C).
3. Agitar en vortex las muestras de suero.
4. Centrifugar las muestras de suero brevemente 90 segundos. a 10,000 g en tubos de microcentrifuga tipo Eppendorf.
5. Asignar posiciones a cada suero y control en la hoja de trabajo (Plate Format Sheet). Recordar apuntar también el lote del kit utilizado para la técnica.
6. Cubrir los pocillos de la placa que no van a utilizarse (con una lámina adhesiva).



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TAMIZAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-008-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	36	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

PROCEDIMIENTO OPERATIVO.

Recomendaciones

1. Centrifugar los tubos de reactivos antes de abrirlos.
2. Se DEBE proceder con cuidado para no contaminar el tampón de lavado ni el reactivo del conjugado concentrado (anti-IgG humana).
3. Se debe proceder con cuidado para controlar la intensidad del vacío. Una fuerte presión de vacío puede causar que las microesferas se unan a las membranas y el recuento de las microesferas sea erróneo.
4. Se debe proceder con cuidado cuando se pipetee dentro de la placa del filtro. Tenga cuidado de no tocar la membrana con la punta. Si la punta de la pipeta entra en contacto con la membrana, puede perforarla y el análisis resultará erróneo.
5. Se deben tomar precauciones para que en las fases de incubación las microesferas no salpiquen y se adhieran a las paredes de los pocillos. Al realizar el análisis por primera vez, analice algunos controles positivos, negativos o de ambos tipos para determinar la velocidad óptima de la plataforma rotatoria o el agitador vórtex. Se ha comprobado que una velocidad de aproximadamente 200 rotaciones por minuto es eficaz en algunos aparatos.
6. La presencia de niveles significativos de anticuerpo no ligado una vez terminado el lavado, debido a un exceso de suero o a un lavado insuficiente, puede reducir la capacidad del análisis para detectar la IgG unida a las microesferas sensibilizadas y dar lugar a resultados erróneos.
7. En cada análisis deben incluirse sueros control positivo y negativo que permiten determinar si se ha producido un error técnico o un fallo de los reactivos.
8. No mezcle componentes de diferentes lotes.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA:

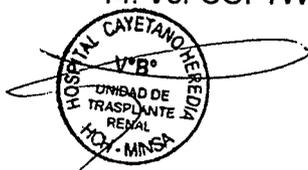
1. Dejar que el tampón de lavado se equilibre con la temperatura ambiente (entre 20 y 24°C) antes de usarlo, y mantener el resto de reactivos a 2-8°C en la oscuridad hasta que los necesite.
2. Diseñar el formato de la hoja de trabajo de formato de placa para asignar una posición en la placa a cada uno de los sueros y controles que va a analizar.
3. Cubra los pocillos no asignados de la placa de filtro con una cubierta de plástico adhesivo. Humedezca previamente los pocillos que va a utilizar con 300 µL de agua destilada. Esperar entre 2 y 5 minutos, retire el agua aspirando suavemente la placa con el sistema de vacío (Para utilizarlo correctamente, consulte las recomendaciones del fabricante).
4. Añadir 40 µL del tampón de lavado a cada pozo según diseño de la hoja de trabajo. Añadir 12 µL de los sueros problema y los controles positivo y negativo. Incubar en rotación durante 15 min.
5. Prepare brevemente (30 segundos) las microesferas de HLA centrifugando el vial a 600–800 g para desprender del tapón o de las paredes del vial todas las microesferas o restos de líquido. Agite bien en vórtex (~ 1 minuto) para resuspender de forma homogénea las microesferas.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TAMIZAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-008-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	37	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

6. Añada 5 μ L de microesferas de HLA a cada uno de los pocillos asignados. Mientras distribuye las microesferas, HLA para mantenerlas en suspensión, agite en vórtex cada 2 minutos el vial de las microesferas.
PRECAUCIÓN: Es importante mantener las microesferas resuspendidas para asegurar que se distribuyan suficientes microesferas en los pocillos y tiempos reducidos de recuento. Si las microesferas no se agitan intermitentemente en vórtex, se depositarán en el fondo del tubo. Esto causará que se dispense una cantidad diferencial de microesferas en los pocillos, lo cual puede afectar negativamente a los tiempos de ensayo y el análisis de los resultados.
7. Cubra la placa con la cubierta de plástico adhesivo y protéjala de la luz con papel de aluminio o en una caja. Incube la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24°C) en la oscuridad y sobre una plataforma rotatoria (200 rotaciones por minuto). Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a 2-8°C, los sueros control y las microesferas que no haya utilizado, para usos futuros.
8. Diluya el conjugado con tampón de lavado y consérvelo en la oscuridad (5 μ L de conjugado en 45 μ L de tampón de lavado por muestra). Para compensar las pérdidas por pipeteo, es aconsejable preparar un (1) volumen extra de conjugado diluido. Cúbralo con papel de aluminio o consérvelo en la oscuridad, a temperatura ambiente, hasta que lo utilice. Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a 2-8°C, el conjugado concentrado que no haya utilizado, para usos futuros.
9. Tras los 30 minutos de incubación, retire la cubierta de plástico adhesivo y añada 100 μ L de tampón de lavado a cada pocillo. Mezcle golpeando el lateral de la placa y aspirela suavemente.
PRECAUCIÓN: Si la intensidad de vacío es excesiva, las microesferas se adherirán a la membrana y puede causar que el análisis de la muestra fracase. Aplique la presión de vacío mínima necesaria para aspirar las muestras.
10. Añada 250 μ L de tampón de lavado a cada pocillo, aspire y repita el procedimiento dos veces más hasta un total de tres lavados.
PRECAUCIÓN: Un lavado incompleto puede reducir la capacidad del conjugado de detectar IgG unida a microesferas sensibilizadas y conducir a resultados falsamente negativos.
11. Añada 50 μ L de conjugado diluido a cada uno de los pocillos. Proteja la placa de la luz con papel de aluminio o en una caja. Colóquela en una plataforma rotatoria (a 200 rotaciones por minuto) o agítela suavemente en vórtex cada 5-10 minutos. Incúbela durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24°C).
12. Con una punta de pipeta limpia añada 130-150 μ L de tampón de lavado en cada pocillo y mezcle para resuspender las microesferas.
13. Recolecte los datos con el aparato Luminex® siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un retraso de más de 3 horas puede aumentar las probabilidades de obtener reacciones falsamente positivas o falsamente negativas. Vuelva a almacenar a 2-8°C el tampón de lavado que no haya utilizado, para usos futuros.
14. Ver SOFTWARE LIFEMATCH IT!® PARA DETECCION DE ANTICUERPOS.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TAMIZAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-008-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	38	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev..02

MANTENIMIENTO DEL APARATO ANTES DE APAGARLO

- Preparar la placa de mantenimiento, colocando agua, etanol al 70% y lejía al 10% en los pozos indicados.
- Ir a "home" y en la pantalla principal seleccionar el icono apagado del equipo "System shutdown"
- Abrir bandeja y colocar placa de mantenimiento con agua, etanol al 70% y lejía al 10%.
- Dar "run" y cuando termine el proceso, apagar la plataforma y el analizador.
- Apagar el ordenador

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS	POSIBLE CAUSA	SOLUCIÓN
Escaso número de microesferas	La mezcla de microesferas no está correctamente suspendida	Agítela en vórtex por pulsos para resuspenderla por completo
	Fallo del aparato – Mal calibrado	Consulte el manual del aparato
	Fallo del aparato – Bloqueo del flujo de muestra	Consulte el manual del aparato
	Microesferas foto blanqueadas	Utilice un nuevo kit
Se ha sobrepasado el umbral de control	Presión de vacío demasiado elevada/microesferas adheridas a la membrana	Reduzca la intensidad del vacío
	Lavado deficiente	Repita los lavados y supervíselos
	Muestra de calidad deficiente	Repita la extracción
Fallo del umbral de control positivo	Conjugado foto blanqueado	Utilice un nuevo kit
	Lavado deficiente	Repita los lavados y supervíselos

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

Cuando los kits LIFECODES LifeScreen se utilizan de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito, los resultados indican la presencia o la ausencia de los anticuerpos IgG anti-HLA. En la detección de anticuerpos específicos de HLA de clase I, los kits LifeScreen Deluxe demostraron una co-positividad del 100% (93,2-100%), una co-negatividad del 95% (85,6-98,2%) y una concordancia del 97% (92,2-99,4%) con 110 muestras de sueros evaluadas cuando se compararon con los resultados obtenidos con el método de LifeScreen (límites de confianza del 95%). En la detección de los anticuerpos específicos de HLA de clase II, los kits LifeScreen Deluxe demostraron una co-positividad del 100% (92,4-100%), una co-negatividad del 94% (84,8-97,5%) y una concordancia del 96% (91,0-99,0%) con 110 muestras de sueros evaluadas cuando se compararon con los resultados obtenidos con el método de LifeScreen (límites de confianza del 95%). Los límites de confianza del 95% se indican en paréntesis.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TAMIZAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-008-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	39	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

REPORTE DE RESULTADOS

Luego de la interacción antígeno anticuerpo, la muestra problema se analiza en el Fluoroanalizador Luminex®. Se compara la intensidad de la señal emitida por cada microesfera con la de una microesfera incluida en la preparación como control negativo, para determinar si aquella es positiva o negativa para el aloanticuerpo unido a ella.

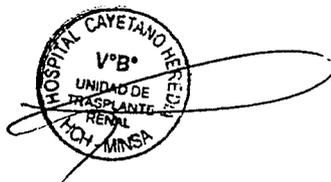
Los Resultados están sujeto a la experticia del personal debidamente capacitado para la interpretación de los mismos.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular e inmunología, el personal que trabaje en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal, deberá estar capacitado debidamente y leer obligatoriamente este POE.

REFERENCIA

1. Klein, J, Sato, A. The HLA System. N. Engl. J. Med. 2000; 343:702 and 343:782.
2. Parham, P. The Immune System. Garland Publishing, N.Y. and London. 2000; 55.
3. Rodey, GE. HLA Beyond Tears (2nd Edition). DeNovo, Inc. Durango, CO. 2000; 163.
4. McKenna, RM; Takemoto, SK; Terasaki, PI. Anti-HLA Antibodies after Solid Organ Transplantation. Transplantation 2000; 69:319.
5. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. Pei R, Lee JH, Shih NJ, Chen M, Terasaki PI. Transplantation. 2003, Jan 15; 75(1):43-9.
6. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S, Terasaki PI. Hum Immunol. 1999 Dec;60(12):1293-302
7. Flow-PRA evaluation for antibody screening in patients awaiting kidney transplantation. Rebibou JM, Chabod J, Bittencourt MC, Thevenin C, Chalopin JM, Herve P, Tiberghien P. Transpl Immunol. 2000 Jun; 8(2):125-8.
8. STANDARDS FOR HISTOCOMPATIBILITY TESTING Version vigente European Federation for Immunogenetics. <http://www.efiweb.org/standards.html>



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	PANEL DE ANTICUERPOS REACTIVOS (PRA) CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-009-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	40	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Determinar el procedimiento a seguir por el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM), en la determinación de anticuerpos totales IgG anti-HLA humano contra un panel de antígenos (HLA-clase I y clase II), en pacientes candidatos a trasplante de órganos sólidos.

ALCANCE

Inicia desde la preparación de suero o plasma de pacientes con Enfermedad Renal Crónica Terminal (ERCT) a trasplantarse en el Hospital Cayetano Heredia u otra sede hospitalaria que requieran determinar el grado de sensibilización a las moléculas de HLA, que puedan generar un rechazo.

RESPONSABILIDAD

Biólogo Molecular.

DEFINICIONES

- **HLA:** Refiere al Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano, importante para la actividad inmune e importante en el pronóstico para la supervivencia de trasplantes alogénicos.
- **HLA clase I:** Corresponde a los Antígenos Leucocitarios Humanos A, B y/o C.
- **HLA clase II:** Corresponde a los Antígenos Leucocitarios Humanos DR, DQ y/o DP.
- **SENSIBILIZACION:** Producción de anticuerpos Anti-HLA específicos que se pueden adquirir por aloinmunización como resultado de embarazos, transfusiones sanguíneas o trasplantes previos.
- **IgG:** Producto de la Respuesta Humoral. Inmunoglobulina específica monomérica producida en la respuesta inmune secundaria e indicador de cronicidad.
- **PRA:** Panel de Anticuerpos Reactivos que mide el grado de sensibilización a los antígenos de HLA en un panel de antígenos HLA consenso de la región de procedencia del paciente.
- **MFI:** Del acrónimo en inglés "Mean Fluorescent Intensity", es la intensidad media fluorescente luego de la lectura por el fluoroanalizador Luminex®.

CONDICIONES GENERALES

- Los reactivos deben ser mantenidos entre 4 y 8 °C.
- Se debe temperar a temperatura ambiente todos los materiales e insumos, con 10 minutos de anticipación.
- Método a utilizar es de Inmunodiagnóstico.

MATERIALES

- Placas Millipore® Filter Plates.
- Selladores en láminas Costar®, Polietileno "Sealing Tape".
- Tubos de microcentrifuga de 2 y 1.5 mL, para la muestra del paciente y diluciones de controles y reactivos.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	PANEL DE ANTICUERPOS REACTIVOS (PRA) CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-009-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	41	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Micropipetas ajustables para dispensar 10 -100 uL y 100 - 1,000 uL y puntas desechables.
- Cronómetro.
- Toallitas papel absorbente.

EQUIPOS

- Fluoroanalizador Luminex®Scan 100/200 Software MATCH ITI® V1.3 para análisis de anticuerpos IMMUCOR®LIFECODES®.
- Centrifuga para separar suero o plasma.
- Microcentrifuga de tubos de 1.5-2 mL.
- Refrigeradora 4°C.
- Congeladora -20°C.
- Hot plate.
- Vortex.
- Bomba de vacío eléctrica Rocker 300.

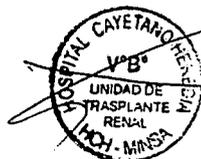
REACTIVOS

LIFECODES Clase I y II (ID y IDv2 respectivamente), es un ensayo de detección cualitativa de anticuerpos reactivos contra un panel de antígenos HLA de clase I y II por separado. Cada kit Contiene 5 componentes en cantidad suficiente para 24 ensayos.

- **LM1B y LM2B Microesferas HLA de clase I y II respectivamente (120 µL):** Mezcla de microesferas, cada una conjugada con glicoproteínas de HLA de clase I y II por separado, más cuatro (4) microesferas de control. El tampón de almacenamiento es un tampón de fosfato que contiene NaCl, Tween-20, ProClin300 y seroalbúmina bovina. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga el producto a la luz durante más de tres horas. Listo para su uso. Consérvelo a 2-8°C en la oscuridad.
- **LMCJ Conjugado concentrado (170 µL):** Reserva (10x) de anticuerpos caprinos anti-IgG humano conjugado con ficoeritrina en un tampón fosfato de almacenamiento que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y seroalbúmina bovina.
- **LMWB Tampón de lavado (30 mL):** Tampón fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y seroalbúmina bovina. Listo para su uso. Consérvelo a 2-8°C y equilíbrelo con la temperatura ambiente (20 a 24°C) antes de usarlo.
- **LMPC Suero control positivo (80 µL):** Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se ha demostrado que están aloinmunizados a los antígenos de HLA (> 85% PRA). Listo para su uso. Consérvelo a 2-8°C.
- **LMNC Suero control negativo (80 µL):** Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se sabe que no tienen ningún anticuerpo contra antígenos HLA (<10% PRA). Listo para su uso. Consérvelo a 2-8°C.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

- Las muestras de suero se obtendrán siguiendo el POE-001-02, luego de la toma de muestra el suero puede ser mantenido a 4°C, por 48 horas, o a -20°C, por más de seis meses.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	PANEL DE ANTICUERPOS REACTIVOS (PRA) CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-009-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	42	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

No Aplica.

CALIBRACION DEL EQUIPO.

Se debe activar el equipo Luminex® por 30 minutos antes de utilizarlo, para que el láser se caliente y se estabilice.

El equipo se calibra cada 120 días, mediante su propio protocolo de Calibración.

CONTROL DE CALIDAD

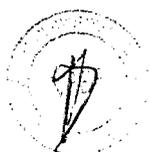
Frecuencia: Con cada nuevo envío. Suero Control positivo y Control negativo del proveedor.

Criterios de aceptación y acciones correctivas:

- El control de calidad de los kits de la Clase I ID, Clase II IDv2 está incorporado en el sistema de análisis mediante los sueros control positivo y negativo. En cada serie analítica deben incluirse estos controles, los cuales permiten determinar si se ha producido un error técnico o un fallo de los reactivos.
- Para estos kits ID, los sueros control positivo reaccionan con la mayoría o con todas las microesferas de HLA conjugadas (> 85%) con la microesfera de HLA conjugada superior, lo cual causa una intensidad mediana mínima de la fluorescencia de $\geq 10,000$. Los sueros control negativo serán negativos (< 10%).
- El juego de microesferas incluye cuatro microesferas de control para verificar los resultados de cada muestra. La microesfera del control positivo está recubierta con IgG humana y debería mostrar una MFI >10,000 con los sueros de control. Si se obtienen valores de MFI inferiores a 10,000 con los sueros de control, es probable que el lavado haya sido insuficiente o que el conjugado no esté en buenas condiciones. Las muestras de los pacientes muestran una amplia gama de reactividad con la microesfera del control positivo, pero deben producir una señal de MFI >3,500. Asimismo, las microesferas de control negativo deberían mostrar una MFI baja. Consulte en la ficha de cada lote, ahí se tendrá mayor información.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Pueden obtenerse resultados erróneos por contaminación bacteriana de los materiales, incubaciones demasiado cortas, lavado o decantado insuficiente de las microesferas, exposición del conjugado a luz parásita u omisión de reactivos o etapas de la prueba.
- La presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobulina en la muestra del paciente puede incrementar las uniones inespecíficas y producir resultados erróneos en el análisis.
- En análisis de laboratorio, se demostró que la timoglobulina (Genzima) da resultados positivos falsos, por lo que los resultados pueden ser incorrectos.
- Este producto detecta los anticuerpos IgG que pueden o no ser linfocitotóxicos. Los anticuerpos detectados son aquellos reactivos dentro de la población de antígenos disponibles detallados en la hoja de registro.
- Los ensayos LIFECODES ID no detectan algunas inmunoglobulinas IgA, IgM de baja avididad y concentración, ni los anticuerpos frente a alelos poco comunes.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	PANEL DE ANTICUERPOS REACTIVOS (PRA) CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-009-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	43	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Debido a la complejidad del análisis de HLA, la interpretación de los datos debería ser revisada por personal calificado. Puede ser útil el conocimiento del paciente y la comprensión de los grupos con reactividad cruzada para asignar la especificidad a un suero determinado.

PROCEDIMIENTO

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS y/o REACTIVOS

1. Los sueros pueden ser frescos o congelados. Se recomienda eliminar agregados mediante centrifugación o filtración.
2. Sacar el buffer de lavado para que se atempere antes de usar (20-24°C).
3. Agitar en vortex las muestras de suero.
4. Centrifugar las muestras de suero brevemente 90 segundos. a 10,000 g en tubos de microcentrifuga tipo Eppendorf.
5. Asignar posiciones a cada suero y control en la hoja de trabajo (Plate Format Sheet). Recordar apuntar también el lote del kit utilizado para la técnica.
6. Cubrir los pocillos de la placa que no van a utilizarse (con una lámina adhesiva).

PROCEDIMIENTO OPERATIVO.

Recomendaciones

1. Centrifugar los tubos de reactivos antes de abrirlos.
2. Se DEBE proceder con cuidado para no contaminar el tampón de lavado ni el reactivo del conjugado concentrado (anti-IgG humana).
3. Se debe proceder con cuidado para controlar la intensidad del vacío. Una fuerte presión de vacío puede causar que las microesferas se unan a las membranas y el recuento de las microesferas sea erróneo.
4. Se debe proceder con cuidado cuando se pipetee dentro de la placa del filtro. Tenga cuidado de no tocar la membrana con la punta. Si la punta de la pipeta entra en contacto con la membrana, puede perforarla y el análisis resultará erróneo.
5. Se deben tomar precauciones para que en las fases de incubación las microesferas no salpiquen y se adhieran a las paredes de los pocillos. Al realizar el análisis por primera vez, analice algunos controles positivos, negativos o de ambos tipos para determinar la velocidad óptima de la plataforma rotatoria o el agitador vórtex. Se ha comprobado que una velocidad de aproximadamente 200 rotaciones por minuto es eficaz en algunos aparatos.
6. La presencia de niveles significativos de anticuerpo no ligado una vez terminado el lavado, debido a un exceso de suero o a un lavado insuficiente, puede reducir la capacidad del análisis para detectar la IgG unida a las microesferas sensibilizadas y dar lugar a resultados erróneos.
7. En cada análisis deben incluirse sueros control positivo y negativo que permiten determinar si se ha producido un error técnico o un fallo de los reactivos.
8. No mezcle componentes de diferentes lotes.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	PANEL DE ANTICUERPOS REACTIVOS (PRA) CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-009-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	44	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA:

1. Dejar que el tampón de lavado se equilibre con la temperatura ambiente (entre 20 y 24°C) antes de usarlo, y mantener el resto de reactivos a 2-8°C en la oscuridad hasta que los necesite.
2. Diseñar el formato de la hoja de trabajo de formato de placa para asignar una posición en la placa a cada uno de los sueros y controles que va a analizar.
3. Cubra los pocillos no asignados de la placa de filtro con una cubierta de plástico adhesivo. Humedezca previamente los pocillos que va a utilizar con 300 µL de agua destilada. Esperar entre 2 y 5 minutos, retire el agua aspirando suavemente la placa con el sistema de vacío (Para utilizarlo correctamente, consulte las recomendaciones del fabricante).
4. Añadir 40 µL del tampón de lavado a cada pozo según diseño de la hoja de trabajo. Añadir 12 µL de los sueros problema y los controles positivo y negativo. Incubar en rotación durante 15 min.
5. Prepare brevemente (30 segundos) las microesferas de HLA centrifugando el vial a 600-800 g para desprender del tapón o de las paredes del vial todas las microesferas o restos de líquido. Agite bien en vórtex (~ 1 minuto) para resuspender de forma homogénea las microesferas.
6. Añada 5 µL de microesferas de HLA a cada uno de los pocillos asignados. Mientras distribuye las microesferas, HLA para mantenerlas en suspensión, agite en vórtex cada 2 minutos el vial de las microesferas.

PRECAUCIÓN: Es importante mantener las microesferas resuspendidas para asegurar que se distribuyan suficientes microesferas en los pocillos y tiempos reducidos de recuento. Si las microesferas no se agitan intermitentemente en vórtex, se depositarán en el fondo del tubo. Esto causará que se dispense una cantidad diferencial de microesferas en los pocillos, lo cual puede afectar negativamente a los tiempos de ensayo y el análisis de los resultados.

7. Cubra la placa con la cubierta de plástico adhesivo y protéjala de la luz con papel de aluminio o en una caja. Incube la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24°C) en la oscuridad y sobre una plataforma rotatoria (200 rotaciones por minuto). Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a 2-8°C, los sueros control y las microesferas que no haya utilizado, para usos futuros.
8. Diluya el conjugado con tampón de lavado y consérvelo en la oscuridad (5 µL de conjugado en 45 µL de tampón de lavado por muestra). Para compensar las pérdidas por pipeteo, es aconsejable preparar un (1) volumen extra de conjugado diluido. Cúbralo con papel de aluminio o consérvelo en la oscuridad, a temperatura ambiente, hasta que lo utilice. Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a 2-8°C, el conjugado concentrado que no haya utilizado, para usos futuros.
9. Tras los 30 minutos de incubación, retire la cubierta de plástico adhesivo y añada 100 µL de tampón de lavado a cada pocillo. Mezcle golpeando el lateral de la placa y aspirela suavemente.

PRECAUCIÓN: Si la intensidad de vacío es excesiva, las microesferas se adherirán a la membrana y puede causar que el análisis de la muestra fracase. Aplique la presión de vacío mínima necesaria para aspirar las muestras.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	PANEL DE ANTICUERPOS REACTIVOS (PRA) CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-009-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	45	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

10. Añada 250 µL de tampón de lavado a cada pocillo, aspire y repita el procedimiento dos veces más hasta un total de tres lavados.
PRECAUCIÓN: Un lavado incompleto puede reducir la capacidad del conjugado de detectar IgG unida a microesferas sensibilizadas y conducir a resultados falsamente negativos.
11. Añada 50 µL de conjugado diluido a cada uno de los pocillos. Proteja la placa de la luz con papel de aluminio o en una caja. Colóquela en una plataforma rotatoria (a 200 rotaciones por minuto) o agítela suavemente en vórtex cada 5-10 minutos. Incúbela durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24°C).
12. Con una punta de pipeta limpia añada 130-150 µL de tampón de lavado en cada pocillo y mezcle para resuspender las microesferas.
13. Recolecte los datos con el aparato Luminex® siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un retraso de más de 3 horas puede aumentar las probabilidades de obtener reacciones falsamente positivas o falsamente negativas. Vuelva a almacenar a 2-8°C el tampón de lavado que no haya utilizado, para usos futuros.
14. Ver SOFTWARE LIFEMATCH IT!® PARA DETECCION DE ANTICUERPOS.

MANTENIMIENTO DEL APARATO ANTES DE APAGARLO

- Preparar la placa de mantenimiento, colocando agua, etanol al 70% y lejía al 10% en los pozos indicados.
- Ir a "home" y en la pantalla principal seleccionar el icono apagado del equipo "System shutdown"
- Abrir bandeja y colocar placa de mantenimiento con agua, etanol al 70% y lejía al 10%.
- Dar "run" y cuando termine el proceso, apagar la plataforma y el analizador.
- Apagar el ordenador

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS	POSIBLE CAUSA	SOLUCIÓN
Escaso número de microesferas	La mezcla de microesferas no está correctamente suspendida	Agítela en vórtex por pulsos para resuspenderla por completo
	Fallo del aparato – Mal calibrado	Consulte el manual del aparato
	Fallo del aparato – Bloqueo del flujo de muestra	Consulte el manual del aparato
	Microesferas foto blanqueadas	Utilice un nuevo kit
	Presión de vacío demasiado elevada/microesferas adheridas a la membrana	Reduzca la intensidad del vacío
Se ha sobrepasado el umbral de control	Lavado deficiente	Repita los lavados y supervíselos
	Muestra de calidad deficiente	Repita la extracción
	Conjugado foto blanqueado	Utilice un nuevo kit



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	PANEL DE ANTICUERPOS REACTIVOS (PRA) CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-009-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	46	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

Fallo del umbral del control positivo	Lavado deficiente	Repita los lavados y supervíselos
---------------------------------------	-------------------	-----------------------------------

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

Cuando los kits LIFECODES ID se utilizan de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito, los resultados indican la presencia o la ausencia de los anticuerpos IgG anti-HLA. A partir de un valor límite del 10% del PRA, el kit Clase I ID demostró una co-positividad del 97,1% (90,2-99,2%), una co-negatividad del 86,4% (75,5-93,0%) y una concordancia del 92,2% (86,3-95,7%) con 129 muestras evaluadas cuando se compararon con los resultados obtenidos con métodos de citometría de flujo (límites de confianza del 95%). El kit Clase II IDv2 demostró una co-positividad del 99,7% de (98,3-99,9%), una co-negatividad 72,2% (66,6-77,1%) y una concordancia del 87,2% (84,3-89,6%) para las 600 muestras evaluadas al compararse con los resultados obtenidos con LIFECODES Clase II ID; los valores de co-negatividad y concordancia reflejan una mejora en la detección de anticuerpos reactivos al DQ con la Clase II IDv2. El kit Clase II IDv2 demostró una concordancia del 100% en los resultados reportados de siete muestras examinadas por seis operadores en tres sitios de pruebas y una concordancia del 100% en los resultados reportados para siete muestras examinadas con tres lotes diferentes por un sólo operador.

En pruebas de laboratorio, se evaluaron los siguientes reactivos y no afectaron a LIFECODES LifeScreen Deluxe: Remicade (Centocor), Rituxin (Genentech), Zenapax (Roche), Campath (Genzyme) y Gammaguard (Baxter). Por el contrario, se demostró que Thymoglobulin (Genzyme) produce resultados positivos falsos. Las muestras que contienen Thymoglobulin pueden dar resultados erróneos.

REPORTE DE RESULTADOS

El porcentaje de PRA (anticuerpos reactivos al panel) para los kits ID se calcula de la siguiente manera:

Clase I ID

$$\% \text{ de PRA Clase I} = \frac{(\text{Número de reacciones positivas de la microesfera} * 100)}{(\text{Número de microesferas del ensayo (No microesferas de control)})}$$

Clase II IDv2

$$\% \text{ de PRA Clase II} = \frac{(\text{Número de microesferas con Ag DR} + \text{Ag DQ que reaccionan} * 100)}{(\text{Número total de microesferas enriquecidas con antígenos DR})}$$

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular e inmunología, el personal que trabaje en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal, deberá estar capacitado debidamente y leer obligatoriamente este POE.

REFERENCIA

Klein, J, Sato, A. The HLA System. N. Engl. J. Med. 2000; 343:702 and 343:782.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	PANEL DE ANTICUERPOS REACTIVOS (PRA) CLASE I y II POR LUMNEX®	POE-009-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	47	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev..02

- Parham, P. The Immune System. Garland Publishing, N.Y. and London. 2000; 55.
- Rodey, GE. HLA Beyond Tears (2nd Edition). DeNovo, Inc. Durango, CO. 2000; 163.
- McKenna, RM; Takemoto, SK; Terasaki, PI. Anti-HLA Antibodies after Solid Organ Transplantation. Transplantation 2000; 69:319.
- Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. Pei R, Lee JH, Shih NJ, Chen M, Terasaki PI. Transplantation 2003, Jan 15; 75(1):43-9
- Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S, Terasaki PI. Hum Immunol. 1999 Dec;60(12):1293-302
- Flow-PRA evaluation for antibody screening in patients awaiting kidney transplantation. Rebibou JM, Chabod J, Bittencourt MC, Thevenin C, Chalopin JM, Herve P, Tiberghien P. Transpl Immunol. 2000 Jun; 8(2):125-8.
- STANDARDS FOR HISTOCOMPATIBILITY TESTING Version vigente European Federation for Immunogenetics. <http://www.efiweb.org/standards.html>



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	DETERMINACION DE ANTIGENO AISLADO (SA), CLASE I Y II POR LUMNEX®	POE-010-02	REVISADO	Centeno Diaz, A
	PÁG.	48	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Determinar el procedimiento a seguir por el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM), en la determinación de anticuerpos totales IgG anti-HLA humano contra un solo antígeno de clase I y/o clase II, técnica conocida como antígeno aislado, útil para el monitoreo de los pacientes trasplantados, y determinación de anticuerpos donante específico.

ALCANCE

Inicia desde la preparación de suero o plasma de pacientes trasplantados, pacientes en lista de espera y pacientes modalidad donante vivo relacionado del Hospital Cayetano Heredia u otra sede hospitalaria que requieran determinar el grado de sensibilización a las moléculas de HLA, que puedan generar un rechazo.

RESPONSABILIDAD

Biólogo Molecular.

DEFINICIONES

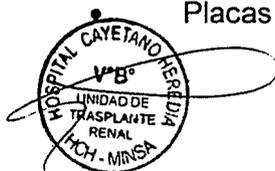
- **HLA:** Refiere al Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano, importante para la actividad inmune e importante en el pronóstico para la supervivencia de trasplantes alogénicos.
- **HLA clase I:** Corresponde a los Antígenos Leucocitarios Humanos A, B y/o C.
- **HLA clase II:** Corresponde a los Antígenos Leucocitarios Humanos DR, DQ y/o DP.
- **SENSIBILIZACION:** Producción de anticuerpos Anti-HLA específicos que se pueden adquirir por aloinmunización como resultado de embarazos, transfusiones sanguíneas o trasplantes previos.
- **IgG:** Producto de la Respuesta Humoral. Inmunoglobulina específica monomérica producida en la respuesta inmune secundaria e indicador de cronicidad.
- **PRA:** Panel de Anticuerpos Reactivos que mide el grado de sensibilización a los antígenos de HLA en un panel de antígenos HLA consenso de la región de procedencia del paciente.
- **MFI:** Del acrónimo en inglés "Mean Fluorescent Intensity", es la intensidad media fluorescente luego de la lectura por el fluoroanalizador Luminex®.
- **SA:** Del acrónimo en inglés "Single Antigens", permite determinar a nivel de un antígeno la presencia de anticuerpos anti-HLA tanto para clase I y II.

CONDICIONES GENERALES

- Los reactivos deben ser mantenidos entre 4 y 8 °C.
- Se debe temperar a temperatura ambiente todos los materiales e insumos, con 10 minutos de anticipación.
- Método a utilizar es de Inmunodiagnóstico.

MATERIALES

Placas Millipore® Filter Plates.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	DETERMINACION DE ANTIGENO AISLADO (SA), CLASE I Y II POR LUMNEX®	POE-010-02	REVISADO	Centeno Diaz, A
	PÁG.	49	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Selladores en láminas Costar®, Polietileno "Sealing Tape".
- Tubos de microcentrifuga de 2 y 1.5 mL, para la muestra del paciente y diluciones de controles y reactivos.
- Micropipetas ajustables para dispensar 10 -100 uL y 100 - 1,000 uL y puntas desechables.
- Cronómetro.
- Toallitas papel absorbente.

EQUIPOS

- Fluoroanalizador, Luminex®Scan 100/200, Software MATCH IT!® V1.3, para análisis de anticuerpos IMMUCOR®LIFECODES®.
- Centrífuga para separar suero o plasma.
- Microcentrifuga de tubos de 1.5-2 mL.
- Refrigeradora 4°C.
- Congeladora -20°C.
- Hot plate.
- Vortex.
- Bomba de vacío eléctrica Rocker 300.

REACTIVOS

LIFECODES Clase I LSA™ y LIFECODES Clase II LSA™ (LSA1 y LSA2 respectivamente), es un ensayo de detección cualitativa de anticuerpos reactivos contra un solo antígeno HLA de clase I o II, por separado. Cada kit Contiene 5 componentes en cantidad suficiente para 24 ensayos.

- **LSA1B y LSA2B Microesferas HLA de clase I y II respectivamente (960 µL):** Mezcla de microesferas, cada una conjugada con una diferente glicoproteína de HLA de clase I más microesferas de control. El tampón de almacenamiento es un tampón de fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y proteínas bovinas. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga, de forma rutinaria, el producto a la luz durante más de tres horas. Consérvelo por debajo de $\leq -65^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad.
- **LSACJ Conjugado concentrado (120 µL):** Reserva (10x) de anticuerpos caprinos anti-IgG humano conjugado con ficoeritrina en un tampón fosfato de almacenamiento que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y seroalbúmina bovina.
- **LMWB Tampón de lavado (30 mL):** Tampón fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y seroalbúmina bovina. Listo para su uso. Consérvelo a 2-8°C y equilibrelo con la temperatura ambiente (20 a 24°C) antes de usarlo.
- **LSAPC1 y LSAPC2 Sueros control positivo (100 µL):** Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se ha demostrado que están aloinmunizados a los antígenos de HLA y reaccionarán con la mayoría de las microesferas LSA de clase I y LSA de clase II respectivamente. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. Consérvelo a 2-8°C.
- **LSANC1 y LSANC2 Sueros control negativo (100 µL):** Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se sabe que no tienen ningún anticuerpo



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	DETERMINACION DE ANTIGENO AISLADO (SA), CLASE I Y II POR LUMNEX®	POE-010-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	50	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

contra antígenos HLA y reaccionarán con unas pocas, o ninguna, de las microesferas LSA de clase I y LSA de clase II respectivamente. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. Consérvelo a 2-8°C.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

- Las muestras de suero se obtendrán siguiendo el POE-001-02, luego de la toma de muestra el suero puede ser mantenido a 4°C, por 48 horas, o a -20°C, por más de seis meses.

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

No Aplica.

CALIBRACION DEL EQUIPO.

Se debe activar el equipo Luminex® por 30 minutos antes de utilizarlo, para que el láser se caliente y se estabilice.

El equipo se calibra cada 120 días, mediante su propio protocolo de Calibración.

CONTROL DE CALIDAD

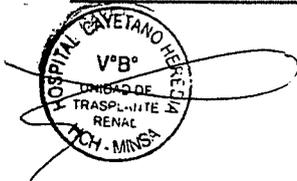
Se recomienda llevar a cabo un control negativo y uno positivo en cada ensayo, tales como un blanco de agua y una muestra previamente tipificada, respectivamente.

El ensayo se debe llevar a cabo según las recomendaciones del prospecto, así como según otros procedimientos de control de calidad que cumplen con las especificaciones locales, estatales, federales y/o de las agencias certificadoras..

Criterios de aceptación y acciones correctivas:

- El control de calidad de LSA de clase I y clase II se desarrolla dentro del sistema de pruebas, incluyendo un suero control positivo y negativo. Estos sueros control deben incluirse con cada prueba que se realice para ayudar a determinar si han ocurrido errores técnicos o fallos de reactivos.
- Los sueros del control positivo reaccionarán con un número elevado de microesferas conjugadas con HLA dando lugar a un patrón similar al indicado en la hoja de registro específica del lote. Los sueros de control negativo reaccionarán con pocas o ninguna de las microesferas conjugadas con HLA dando lugar a valores de MFI cruda $\leq 1,000$.
- Los juegos de microesferas incluyen microesferas de control para verificar los resultados de cada muestra. La microesfera de control positivo está recubierta con IgG humana y debería indicar una MFI $\geq 10,000$ con los sueros control. Si se obtienen valores de MFI inferiores a 10,000 con los sueros control, es probable que el lavado del ensayo haya sido insuficiente o que el conjugado no esté en buenas condiciones. Las muestras de pacientes muestran un amplio rango de reactividad con la microesfera de control positivo, pero siempre deberían generar una señal de MFI $\geq 10,000$. La microesfera de control negativo debería generar valores bajos de MFI con los sueros de control. Consulte en la hoja de registro específica del lote los límites observados para las microesferas de control con los sueros de control.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	DETERMINACION DE ANTIGENO AISLADO (SA), CLASE I Y II POR LUMNEX®	POE-010-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	51	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Pueden obtenerse resultados erróneos por contaminación bacteriana de los materiales, incubaciones demasiado cortas, lavado o decantado insuficiente de las microesferas, exposición del conjugado a luz parásita u omisión de reactivos o etapas de la prueba.
- La presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobina en la muestra del paciente puede incrementar las uniones inespecíficas y producir resultados erróneos en este ensayo.
- Los anticuerpos detectados por los kits LSA son aquellos reactivos dentro de la población de antígenos disponibles detallados en la hoja de registro.
- Las glicoproteínas de un solo antígeno HLA, de clase I y II, de LIFECODES se obtuvieron de líneas de células que indicaban antígenos individuales HLA.
- Algunos IgG con baja avidéz o título bajo, IgA, IgM y anticuerpos monoespecíficos contra antígenos no incluidos en el panel, no se detectarán con ensayos de un solo antígeno de LIFECODES.
- Los títulos de anticuerpos del suero están específicamente relacionados al paciente y a momentos determinados. Si muchas microesferas están produciendo valores de MFI mayores de 15,000, puede ser necesario diluir los sueros para detectar mejor los anticuerpos IgG.
- Debido a la complejidad del análisis de HLA, la interpretación de los datos debería ser revisada por personal calificado. Puede ser útil el conocimiento del paciente y la comprensión de los grupos con reactividad cruzada para asignar la especificidad a un suero determinado.

PROCEDIMIENTO

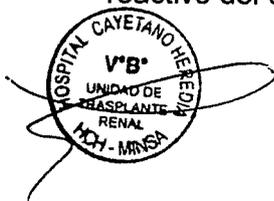
RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS y/o REACTIVOS

1. Los sueros pueden ser frescos o congelados. Se recomienda eliminar agregados mediante centrifugación o filtración.
2. Sacar el buffer de lavado para que se atempere antes de usar (20-24°C).
3. Agitar en vortex las muestras de suero.
4. Centrifugar las muestras de suero brevemente 90 segundos. a 10,000 g en tubos de microcentrifuga tipo Eppendorf.
5. Asignar posiciones a cada suero y control en la hoja de trabajo (Plate Format Sheet). Recordar apuntar también el lote del kit utilizado para la técnica.
6. Cubrir los pocillos de la placa que no van a utilizarse (con una lámina adhesiva).

PROCEDIMIENTO OPERATIVO.

Recomendaciones:

1. Centrifugar los tubos de reactivos antes de abrirlos.
2. Se DEBE proceder con cuidado para no contaminar el tampón de lavado ni el reactivo del conjugado concentrado (anti-IgG humana).



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	DETERMINACION DE ANTIGENO AISLADO (SA), CLASE I Y II POR LUMNEX®	POE-010-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	52	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

3. Se debe proceder con cuidado para controlar la intensidad del vacío. Una fuerte presión de vacío puede causar que las microesferas se unan a las membranas y el recuento de las microesferas sea erróneo.
4. Se debe proceder con cuidado cuando se pipetee dentro de la placa del filtro. Tenga cuidado de no tocar la membrana con la punta. Si la punta de la pipeta entra en contacto con la membrana, puede perforarla y el análisis resultará erróneo.
5. Se deben tomar precauciones para que en las fases de incubación las microesferas no salpiquen y se adhieran a las paredes de los pocillos. Al realizar el análisis por primera vez, analice algunos controles positivos, negativos o de ambos tipos para determinar la velocidad óptima de la plataforma rotatoria o el agitador vórtex. Se ha comprobado que una velocidad de aproximadamente 200 rotaciones por minuto es eficaz en algunos aparatos.
6. La presencia de niveles significativos de anticuerpo no ligado una vez terminado el lavado, debido a un exceso de suero o a un lavado insuficiente, puede reducir la capacidad del análisis para detectar la IgG unida a las microesferas sensibilizadas y dar lugar a resultados erróneos.
7. En cada análisis deben incluirse sueros control positivo y negativo que permiten determinar si se ha producido un error técnico o un fallo de los reactivos.
8. No mezcle componentes de diferentes lotes.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA:

1. Dejar que el tampón de lavado se equilibre con la temperatura ambiente (entre 20 y 24°C) antes de usarlo, y mantener el resto de reactivos a 2-8°C en la oscuridad hasta que los necesite.
2. Diseñar el formato de la hoja de trabajo de formato de placa para asignar una posición en la placa a cada uno de los sueros y controles que va a analizar.
3. Cubra los pocillos no asignados de la placa de filtro con una cubierta de plástico adhesivo. Humedezca previamente los pocillos que va a utilizar con 300 µL de agua destilada. Esperar entre 2 y 5 minutos, retire el agua aspirando suavemente la placa con el sistema de vacío (Para utilizarlo correctamente, consulte las recomendaciones del fabricante).
4. Prepare brevemente (30 segundos) las microesferas LSA centrifugando el vial a 600 – 800 x g para desprender del tapón o de las paredes del vial todas las microesferas o restos de líquido. Agite bien en vórtex (-1 minuto) para resuspender de forma homogénea las microesferas.
5. Añada 40 µL de microesferas LSA a cada uno de los pocillos asignados. Mientras distribuye las microesferas, agite en vórtex cada 2 minutos el vial de las microesferas LSA para mantenerlas en suspensión, y luego añada 10 µL del suero del paciente y de los controles específicos para LSA1 y LSA2.
6. Cubra la placa con la cubierta de plástico adhesivo y protéjala de la luz con papel de aluminio o en una caja. Incube la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24°C) en la oscuridad y sobre una plataforma rotatoria (200 rotaciones por



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	DETERMINACION DE ANTIGENO AISLADO (SA), CLASE I Y II POR LUMNEX®	POE-010-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	53	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- minuto). Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a 2-8°C, los sueros controles y las microesferas LSA1 y LSA2 que no haya utilizado a -65°C, para usos futuros.
- Diluya el conjugado con tampón de lavado y consérvelo en la oscuridad (5 µL de conjugado en 45 µL de tampón de lavado por muestra). Para compensar las pérdidas por pipeteo, es aconsejable preparar un (1) volumen extra de conjugado diluido. Cúbralo con papel de aluminio o consérvelo en la oscuridad, a temperatura ambiente, hasta que lo utilice. Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a 2-8°C, el conjugado concentrado que no haya utilizado, para usos futuros.
 - Tras los 30 minutos de incubación, retire la cubierta de plástico adhesivo y añada 100 µL de tampón de lavado a cada pocillo. Mezcle golpeando el lateral de la placa y aspirela suavemente.
PRECAUCIÓN: Si la intensidad de vacío es excesiva, las microesferas se adherirán a la membrana y puede causar que el análisis de la muestra fracase. Aplique la presión de vacío mínima necesaria para aspirar las muestras.
 - Añada 250 µL de tampón de lavado a cada pocillo, aspire y repita el procedimiento dos veces más hasta un total de tres lavados.
PRECAUCIÓN: Un lavado incompleto puede reducir la capacidad del conjugado de detectar IgG unida a microesferas sensibilizadas y conducir a resultados falsamente negativos.
 - Añada 50 µL de conjugado diluido a cada uno de los pocillos. Proteja la placa de la luz con papel de aluminio o en una caja. Colóquela en una plataforma rotatoria (a 200 rotaciones por minuto) o agítela suavemente en vórtex cada 5-10 minutos. Incúbela durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24°C).
 - Con una punta de pipeta limpia añada 130-150 µL de tampón de lavado en cada pocillo y mezcle para resuspender las microesferas.
 - Recolecte los datos con el aparato Luminex® siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un retraso de más de 3 horas puede aumentar las probabilidades de obtener reacciones falsamente positivas o falsamente negativas. Vuelva a almacenar a 2-8°C el tampón de lavado que no haya utilizado, para usos futuros.
 - Ver SOFTWARE LIFEMATCH IT!® PARA DETECCION DE ANTICUERPOS.

MANTENIMIENTO DEL APARATO ANTES DE APAGARLO

- Preparar la placa de mantenimiento, colocando agua, etanol al 70% y lejía al 10% en los pozos indicados.
- Ir a "home" y en la pantalla principal seleccionar el icono apagado del equipo "System shutdown"
- Abrir bandeja y colocar placa de mantenimiento con agua, etanol al 70% y lejía al 10%.
- Dar "run" y cuando termine el proceso, apagar la plataforma y el analizador.
- Apagar el ordenador



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	DETERMINACION DE ANTIGENO AISLADO (SA), CLASE I Y II POR LUMNEX®	POE-010-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	54	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS	POSIBLE CAUSA	SOLUCIÓN
Escaso número de microesferas	La mezcla de microesferas no está correctamente suspendida	Agítela en vórtex por pulsos para resuspenderla por completo
	Fallo del aparato – Mal calibrado	Consulte el manual del aparato
	Fallo del aparato – Bloqueo del flujo de muestra	Consulte el manual del aparato
	Microesferas foto blanqueadas	Utilice un nuevo kit
	Presión de vacío demasiado elevada/microesferas adheridas a la membrana	Reduzca la intensidad del vacío
Se ha sobrepasado el umbral de control	Lavado deficiente	Repita los lavados y supervíselos
	Muestra de calidad deficiente	Repita la extracción
	Conjugado foto blanqueado	Utilice un nuevo kit
Asignación positiva para los sueros de control negativo (> 2 microesferas conjugadas con HLA) o MFI >10.000	Adición de muestra incorrecta	Repita y controle los lavados para asegurar que las microesferas se resuspenden correctamente
	Lavado deficiente	
	Contaminación de la mezcla de microesferas, el tampón de lavado, los sueros de control negativo o el conjugado concentrado con muestra positiva	Reduzca la intensidad del vacío
		Utilice un nuevo kit

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

Cuando se utiliza el kit LIFECODES LSA siguiendo el procedimiento descrito, el resultado revela la presencia o la ausencia de anticuerpos IgG HLA. Para el ensayo clínico se usaron los valores de corte estándar de LABScreen, de modo que se consideraron positivas las puntuaciones > 4.

LSA Clase I

El kit LIFECODES LSA Clase I mostró una co-positividad del 93,7 % (93,4 %) para 151 muestras con antígenos coincidentes cuando se compararon con los resultados obtenidos por el método LABScreen Single Antigen HLA Class I- Combi, Cat. no LS1A04 (límite inferior del intervalo de confianza del 95% unilateral).

LSA Clase II

El kit LIFECODES LSA Clase II mostró una co-positividad del 90,5 % (89,9 %) para 150 muestras con antígenos coincidentes cuando se compararon con los resultados obtenidos por el método LABScreen Single Antigen HLA Class II- Group 1, Cat. no LS2A01 (límite inferior del intervalo de confianza del 95 % unilateral).

REPORTE DE RESULTADOS

Introduzca los valores de Intensidad Mediana de Fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) cruda para cada microesfera en la hoja de registro específica del lote. Para



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	DETERMINACION DE ANTIGENO AISLADO (SA), CLASE I Y II POR LUMNEX®	POE-010-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	55	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

determinar si una microesfera es positiva, primero determine si el valor de MFI de cada microesfera con antígeno unido es superior al umbral indicado en la hoja de registro específica del lote que se suministra con el kit. Si el valor de MFI de una determinada microesfera con antígeno unido es superior al umbral, divida su MFI por el del antígeno de más baja clasificación (LRA, por sus siglas en inglés) del locus correspondiente, para obtener el cociente MFI/Antígeno de más baja clasificación (MFI/LRA). El LRA de cada locus es el valor de MFI de la microesfera con antígeno de más baja clasificación para ese locus.

Consulte en la hoja de registro específica del lote que se suministra con el kit, la lista de antígenos presentes en cada microesfera, y el valor de corte para determinar el resultado positivo/negativo para cada microesfera con antígeno unido. Se considera que una microesfera con antígeno unido es positiva cuando el valor de MFI es superior al umbral de MFI y el cociente MFI/LRA es superior al valor de corte.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular e inmunología, el personal que trabaje en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal, deberá estar capacitado debidamente y leer obligatoriamente este POE.

REFERENCIA

1. Klein, J, Sato, A. The HLA System. N. Engl. J. Med. 2000; 343:702 and 343:782.
2. Parham, P. The Immune System. Garland Publishing, N.Y. and London. 2000; 55.
3. Rodey, GE. HLA Beyond Tears (2nd Edition). DeNovo, Inc. Durango, CO. 2000; 163.
4. McKenna, RM; Takemoto, SK; Terasaki, PI. Anti-HLA Antibodies after Solid Organ Transplantation. Transplantation 2000; 69:319.
5. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. Pei R, Lee JH, Shih NJ, Chen M, Terasaki PI. Transplantation. 2003, Jan 15; 75(1):43-9.
6. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S, Terasaki PI. Hum Immunol. 1999 Dec;60(12):1293-302
7. Flow-PRA evaluation for antibody screening in patients awaiting kidney transplantation. Rebibou JM, Chabod J, Bittencourt MC, Thevenin C, Chalopin JM, Herve P, Tiberghien P. Transpl Immunol. 2000 Jun; 8(2):125-8.
8. STANDARDS FOR HISTOCOMPATIBILITY TESTING Version vigente European Federation for Immunogenetics. <http://www.efiweb.org/standards.html>



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SSP, BAJA RESOLUCION.	POE-011-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	56	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Realizar el tipaje molecular HLA de los Loci; A, B y DRB1 (baja resolución), mediante PCR, utilizando primers alelos específicos, los amplicones serán visualizados mediante electroforesis, procedimiento a seguir por el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM).

FUNDAMENTO SSP

Múltiples amplificaciones por PCR de fragmentos de exones de los genes HLA-A, HLA-B, y HLA-DRB1 con primers complementarios de las regiones polimórficas. Solo se amplifican las regiones complementarias y deben tener el tamaño correspondiente al número de pb teórico, según la posición de los primers. Visualización en gel de agarosa.

ALCANCE

Inicia desde la extracción del ADN de la muestra de sangre hasta la emisión del resultado correspondiente al tipaje HLA del paciente. Aplica para muestras de pacientes ambulatorios, particulares, hospitalizados y de emergencia que acuden al Hospital Cayetano Heredia (HCH) y requieran tipificación HLA.

RESPONSABILIDAD

Biólogo Molecular.

DEFINICIONES

- **PCR SSP para tipificación de HLA Baja Resolución:** es un método de evaluación de la tipificación de HLA basado en PCR que se ha diseñado para tipificar los loci de HLA clase I (A, B y C) y clase II (DRB, DQB), mediante PCR utilizando primers específicos de secuencia. Se utilizan las fórmulas de conjuntos de cebadores específicos de alelos descritos por el comité internacional de nomenclatura de la OMS para amplificar el ADN genómico mediante una bandeja térmica de 96 pocillos. Una vez finalizado el ciclo, los productos de PCR se cargan en gel de agarosa, Tras la electroforesis, el gel se fotografía y se interpreta con ayuda de una hoja de trabajo sobre los patrones de amplificación específicos. Este ensayo puede realizarse en 2,5 horas tras el aislamiento del ADN. (La duración varía en función de la marca y el modelo de termociclador utilizado). Los alelos analizados cubren el 95 % de las frecuencias de HLA de la población mundial-HLA tanto para clase I y II.

CONDICIONES GENERALES

- Las muestras de sangre humana, deben obtenerse en tubos al vacío que contenga como anticoagulantes Ácido Cítrico - Dextrosa (ACD) o EDTA. NO heparina ya que esta puede inhibir la amplificación por PCR.
- La concentración de la muestra de ADN extraído debe ser aproximadamente 50 ng/uL. El OD 260/280 debe estar entre 1.7 y 1.9.
- Los reactivos deben ser mantenidos entre 4 y - 20 °C.
- Debe mantenerse un flujo UNIDIRECCIONAL, desde el área de pre-PCR hacia el área de post-PCR NUNCA en sentido contrario.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SSP, BAJA RESOLUCION.	POE-011-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	57	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Cada área debe tener sus propias micropipetas y puntas con filtro estériles evitando contaminación con amplicones.
- Método a utilizar es de Biología Molecular.

MATERIALES

- Placas de ensayo de 96 pocillos, impregnado con una solución de cebador SSP liofilizado consistente en cebadores de alelos y un par de cebadores control. Incluido en el Kit.
- Hoja de sellado para las placas de PCR. Incluido en el Kit.
- Tubos de microcentrifuga estéril, 2 mL.
- Agua grado biología Molecular estéril.
- Sistema para electroforesis E-gel®, gel de agarosa al 2 %.

EQUIPOS

- Cabina de Flujo Laminar, Clase II.
- Micropipetas 200 uL, 20 uL, 10 uL y 2 uL y sus correspondientes puntas estériles con filtro.
- Termociclador para placas (96 pocillos), SenseQuest, Labcycler®
- Fuente de alimentación para electroforesis (E-gel® iBase™ Power System).
- Analizador de imágenes, MicroDOC System, Cleaver Scientific®.
- Transiluminador UV.

REACTIVOS

- kit de tipificación molecular de HLA-ABDR SSP, ALLSET GOLD HLA ABDRDQ LOW RES, 10 Tests. Invitrogen, Ref. 54360D.
- Taq ADN-polimerasa 5 unidades/uL. Incluido en el Kit.
- Marcador de peso molecular 50 a 2000 pb para HLA-SSP (E-Gel Low Range Quantitative DNA Ladder) Invitrogen, Ref. 12373031.
- Gel de agarosa pre-formado E-gel®96, Invitrogen, Ref. A10570.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

El ADN a ser tipificado ha sido purificado y cuantificado siguiendo el POE-002-02, previamente para alcanzar el nivel mínimo de pureza y concentración que requiere la prueba.

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

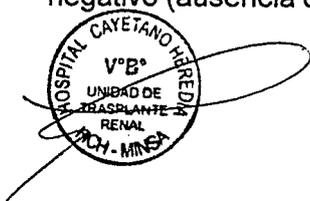
No Aplica.

CALIBRACION DEL EQUIPO.

El método es manual.

CONTROL DE CALIDAD

El sistema incluye un control negativo, cuyo resultado en gel de electroforesis debe ser negativo (ausencia de banda), indicando que no se produjo contaminación durante el proceso.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SSP, BAJA RESOLUCION.	POE-011-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	58	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev..02

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Cuando se desea emplear un reactivo o equipo que no figura en la lista de los recomendados por el fabricante es necesario llevar a cabo una validación previa del mismo empleando muestras con perfiles ya conocidos.

PROCEDIMIENTO

PREPARACION DEL MASTER MIX:

1. El master mix se prepara para 96 pocillos, siguiendo la siguiente tabla.

N° Pocillos	Mix SSP (uL)	Agua (uL)	ADN (50ng/uL)	Taq Poly (5U/uL)	Vol. Total (uL)
96	460	608	125	7	1200

2. Si el DNA tuviera otra concentración, ej. (80ng/uL) entonces
3. $C1V1=C2V2$
 $80(V1)=50(125)$
 $V1=93.1$ uL
4. Luego corregir volumen de agua para obtener volumen final de 1200 uL.
5. La polimerasa se debe colocar al final (recordar colocar antes 11 uL en el pocillo, control (A12)).
6. Luego agregar 11 uL del máster mix completo a cada pocillo.
7. Cubra la bandeja con una hoja de sellado. Las muestras están lista para ser amplificadas.
8. Guarde los reactivos a la temperatura indicada.
9. La orientación correcta de las bandejas se identifica gracias al pocillo azul para el control de la contaminación situado en el pocillo (A12).

AMPLIFICACIÓN:

1. Colocar la placa en el termociclador.
2. Los ciclos de amplificación a seguir son:

Pasos	Temp. (C°)	Tiempo (seg)	Acción
Denaturar	96	60	Denaturar
5 ciclos	96	25	Denaturar
	70	50	Hibridación
	72	45	Extensión
21 ciclos	96	25	Denaturar
	65	50	Hibridación
	72	45	Extensión
4 ciclos	96	25	Denaturar
	55	60	Hibridación
	72	120	Extensión
Mantener	4	∞	Mantener



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SSP, BAJA RESOLUCION.	POE-011-02	REVISADO	Centeno Diaz, A
	PÁG.	59	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Al finalizar el programa, retirar las muestras del termociclador y realizar la electroforesis. Si no se realiza la electroforesis inmediatamente la placa puede ser guardada a 4°C hasta por 1 semana.

ELECTROFORESIS:

- A toda la placa añadir 10 uL de agua destilada estéril a cada pocillo.
- Cargar 20 uL del amplicón, al gel pre-formado, respetando posición de cada pocillo en la placa.
- La última fila colocar 4 uL de marcador de pb (E-Gel Low Range DNA Ladder).
- Correr el gel por 12-13 min.

ANALISIS DE IMAGEN:

- Luego de la corrida electroforética, colocar el gel pre-formado, en el analizador de imágenes.
- El documentador se encuentra acondicionado (parámetros) para la toma de la foto.
- Encender la cámara, luego el transluminador UV.
- Tomar 2 a 3 fotos, dándole el zoom correspondiente.
- Retirar la memoria de la cámara y analizar en la computadora con el programa E-editor.
- Luego siguiendo las recomendaciones, editar la foto para luego cargarlo en el programa SSP UniMatch v 6.0, para el análisis correspondiente.

REPORTE DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos luego de analizar las bandas amplicones, mediante el programa SSP UniMatch, nos dará un tipaje a baja resolución de los Loci A, B, DRB1 y DQB1.

Ejemplo:

Results limited by low res:

HLA-A*02	HLA-A*24
HLA-B*15	HLA-B*27
HLA-DRB1*09	HLA-DRB1*14

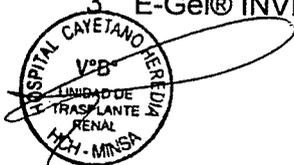
Positive Lanes: 11,14,17,22,27,29,32,37,54,55,59,62,63,65,86,

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular, el personal que trabaje en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal, deberá estar capacitado debidamente y leer obligatoriamente este POE.

REFERENCIA

- AllSet+ Gold SSP INVITROGEN™. Life Technologies. User Manual.
 - [http://www.onelambda.com/content/dam/onelambda/en/TDX/Documents/securitydocs/docs/Product Insert/ASG-TRAY-PI-EN-00.pdf](http://www.onelambda.com/content/dam/onelambda/en/TDX/Documents/securitydocs/docs/Product%20Insert/ASG-TRAY-PI-EN-00.pdf)
- E.Base™ Electrophoresis Device. INVITROGEN™. Life Technologies. User Manual.
- E-Gel® INVITROGEN™. Life Technologies, Technical Guide302.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SSO, LUMINEX®.	POE-012-02	REVISADO	Centeno Diaz, A
	PÁG.	60	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Realizar el tipaje molecular HLA de los Loci; A, B y DRB1 (baja / mediana resolución), mediante PCR e hibridación con oligonucleótidos alelos específicos, utilizando la plataforma LUMINEX®, procedimiento a seguir por el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM).

Fundamento PCR-SSO

Amplificación del ADN genómico correspondiente a diferentes exones del gen HLA de los Loci; A, B y DRB1 utilizando cebadores. Hibridación con sondas fijadas en un soporte sólido. Identificación de los fragmentos que han hibridado con las sondas específicas por medio de un fluoroanalizador.

ALCANCE

Inicia desde la extracción del ADN de la muestra de sangre hasta la emisión del resultado correspondiente al tipaje HLA del paciente. Aplica para muestras de pacientes ambulatorios, particulares, hospitalizados y de emergencia que acuden al Hospital Cayetano Heredia (HCH) y requieran tipificación HLA.

RESPONSABILIDAD

Biólogo Molecular.

DEFINICIONES

- **PCR SSO para tipificación de HLA (Baja / Mediana Resolución):** es un método para la tipificación HLA basado en PCR e hibridación de los amplicones. Está diseñado para tipificar el gen HLA mediante PCR utilizando primers específicos que amplifican los diferentes exones del gen HLA de los Loci; A, B y DRB1 utilizando cebadores, luego se hará la hibridación con los oligonucleótidos alelos específicos en un soporte sólido (esferas), dicha hibridación será determinada mediante un fluoroanalizador LUMINEX®.

CONDICIONES GENERALES

- Las muestras de sangre humana, deben obtenerse en tubos al vacío que contenga como anticoagulantes Ácido Cítrico - Dextrosa (ACD) o EDTA. NO heparina ya que esta puede inhibir la amplificación por PCR.
- La concentración de la muestra de ADN extraído debe ser aproximadamente 50 ng/uL. El OD 260/280 debe estar entre 1.7 y 1.9.
- Los reactivos deben ser mantenidos entre 4 y - 20 °C.
- Debe mantenerse un flujo UNIDIRECCIONAL, desde el área de pre-PCR hacia el área de post-PCR NUNCA en sentido contrario.
- Cada área debe tener sus propias micropipetas y puntas con filtro estériles evitando contaminación con amplicones.
- Método a utilizar es de Biología Molecular.

MATERIALES



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SSO, LUMINEX®.	POE-012-02	REVISADO	Centeno Diaz, A
	PÁG.	61	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev..02

- Microtubos de PCR de 0.2 mL.
- Placas de 96 pocillos Costar®, Polietileno.
- Hoja de sellado para las placas de PCR.
- Tubos de microcentrifuga de 2 y 1.5 mL,
- Micropipetas ajustables para dispensar 10-100 uL y 100-1,000 uL y puntas desechables.
- Cronómetro.
- Agua grado biología Molecular estéril.

EQUIPOS

- Cabina de Flujo Laminar, Clase II.
- Termociclador para placas (96 pocillos), SenseQuest, Labcycler®
- Fluoroanalizador, Luminex®Scan 100/200, Software MATCH IT!® V1.3, para análisis de ADN IMMUCOR®LIFECODES®.
- Microcentrifuga de tubos de 1.5-2 mL.
- Refrigeradora 4°C.
- Congeladora -20°C.
- Hot plate.
- Vórtex.

REACTIVOS

LCT-AE Kit LIFECODES de tipificación de HLA-A eRES SSO, Referencia N°628913.

- MX-A, Mezcla maestra LIFECODES HLA-A.
- BM-A, Mezcla de sondas LIFECODES HLA-A.
- BM-AeRES, Mezcla de sondas LIFECODES HLA-A eRES.
- TAQ, Polimerasa taq LIFECODES.

LCT-BE Kit LIFECODES de tipificación de HLA-B eRES SSO, Referencia N°628917.

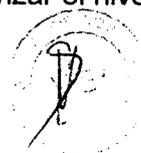
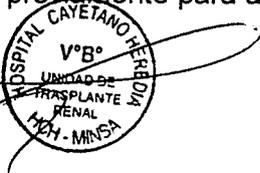
- MX-B, Mezcla maestra LIFECODES HLA-B.
- BM-B, Mezcla de sondas LIFECODES HLA-B.
- BM-BeRES, Mezcla de sondas LIFECODES HLA-B eRES.
- TAQ, Polimerasa taq LIFECODES

LCT-DR1E Kit LIFECODES de tipificación de HLA-DRB1 eRES SSO Referencia N°628925

- MX-DRB1, Mezcla maestra LIFECODES HLA-DRB1.
- BM-DRB1, Mezcla de sondas LIFECODES HLA-DRB1.
- BM-DRB1eRES, Mezcla de sondas LIFECODES HLA-DRB1 eRES.
- TAQ, Polimerasa taq LIFECODES

OBTENCIÓN DE MUESTRA

El ADN a ser tipificado ha sido purificado y cuantificado siguiendo el POE-002-02, previamente para alcanzar el nivel mínimo de pureza y concentración que requiere la prueba.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SSO, LUMINEX®.	POE-012-02	REVISADO	Centeno Diaz, A
	PÁG.	62	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

No Aplica.

CALIBRACION DEL EQUIPO.

Se debe activar el equipo Luminex® por 30 minutos antes de utilizarlo, para que el láser se caliente y se estabilice.

El equipo se calibra cada 120 días, mediante su propio protocolo de Calibración.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda llevar a cabo un control negativo y uno positivo en cada ensayo, tales como un blanco de agua y una muestra previamente tipificada, respectivamente.

El ensayo se debe llevar a cabo según las recomendaciones del prospecto, así como según otros procedimientos de control de calidad que cumplen con las especificaciones locales, estatales, federales y/o de las agencias certificadoras.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Cuando se desea emplear un reactivo o equipo que no figura en la lista de los recomendados por el fabricante es necesario llevar a cabo una validación previa del mismo empleando muestras con perfiles ya conocidos.
- Las condiciones descritas para el PCR y el análisis deben controlarse con precisión. Las desviaciones de estos parámetros pueden hacer fracasar el procedimiento.
- Las microesferas deben estar precalentadas y en suspensión total antes de su uso. Esto garantiza que los componentes del tampón de hibridación estén disueltos.
- Las incubaciones a 47 °C y 56 °C exigen una gran exactitud (+/- 0,5 °C). Debe emplearse un termociclador.
- El tiempo que se mantiene la muestra a 56°C es crucial y no debe superar los 13 minutos en total. Esto comprende los 8 minutos de la incubación más un máximo de 5 minutos para diluir todas las muestras con la mezcla de solución diluyente y PE-estreptavidina.
- Una vez diluidas, las muestras son estables a temperatura ambiente (18 a 30°C) durante un máximo de 2 horas (protéjalas de la luz). Dado que una placa de 96 pocillos llena puede tardar hasta 1,5 horas en pasar por el Fluoroanalizador Luminex®, el análisis debe iniciarse como máximo 30 minutos después de la dilución para garantizar que la última muestra se analice dentro del límite de las dos horas.
- No mezcle componentes de otros kits y lotes.
- Debido a la complejidad de la tipificación de HLA, la interpretación de los datos y los resultados de la tipificación deberían ser revisados por personal calificado.

PROCEDIMIENTO

PURIFICACION DEL ADN GENOMICO.




	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SSO, LUMINEX®.	POE-012-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PAG.	63	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

La Purificación del ADN genómico se puede hacer con un método de su elección; la concentración final debe estar comprendida entre 10 y 200 ng/μl. En caso necesario, ajuste con agua exenta de nucleasas (ver POE-002-02).

AMPLIFICACION DEL ADN POR PCR.

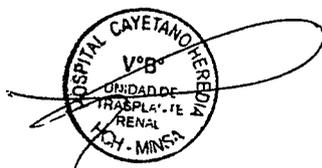
- Deje que la temperatura del Master Mix se iguale con la temperatura ambiente (18-30°C).
- Agite suavemente los reactivos en vórtex durante 10 segundos aproximadamente. Esto garantizará que las sales estén disueltas.
- Centrifúguelos brevemente (5-10 segundos) en la microcentrífuga para que el contenido se desplace al fondo del tubo.
- Tomando como referencia la tabla N°01, prepare los componentes para la amplificación para n+1 reacciones, utilizando de cada componente

Tabla N°01

Componentes	Cantidad por reacción de PCR por muestra
Master Mix LIFECODES	6 uL
ADN genómico 10-200 ng/uL	Total aprox. 80 ng.
Taq polimerasa LIFECODES.	0.2 uL (1U).
Agua libre de nucleasas	Hasta un volumen de 20 uL.

- (excepto el ADN) la cantidad indicada por reacción. Complete con agua exenta de nucleasas hasta un volumen final de 20 μL por reacción. Agite suavemente en vórtex.
- Pipetee la cantidad adecuada de ADN genómico (40-120ng) en los tubos de PCR.
- Distribuya alícuotas de la mezcla ampliada en los tubos de PCR que contienen el ADN genómico. (El volumen total de la mezcla maestra y el ADN genómico debe ser de 20 μl para la reacción de cada muestra.)
- Cierre bien los tubos para evitar la evaporación durante el PCR.
- Coloque las muestras en el termociclador y ejecute el programa.

Pasos	Temp. (C°)	Tiempo (seg)	Acción
Denaturar	95	180	Denaturar
12 ciclos	95	15	Denaturar
	60	30	Hibridación
	72	30	Extensión
28 ciclos	95	10	Denaturar
	63	30	Hibridación
	72	30	Extensión
1 ciclos	72	120	Extensión
Mantener	4	∞	Mantener



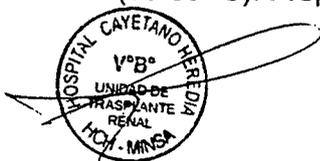
	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SSO, LUMINEX®.	POE-012-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	64	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev..02

- Al finalizar el programa, retirar las muestras del termociclador y realizar la electroforesis (opcional). El producto amplificado es estable a 4°C hasta por 1 semana.

HIBRIDACION

- Asegúrese de que los componentes del tampón de hibridación de la mezcla de sondas LIFECODES estén solubilizados y las microesferas totalmente suspendidas.
- Encienda el Luminex® Instrument y la Plataforma XY para que adquieran la temperatura correspondiente, durante 30 minutos.
- Caliente la mezcla de sondas en un bloque calefactor a 55-60 °C durante al menos 5-10 minutos para solubilizar totalmente los componentes de la mezcla de sondas.
- Trate brevemente (~15 s) la mezcla de sondas con ultrasonidos y agítela en vórtex durante 15 segundos aproximadamente para suspender por completo las microesferas.
- En cada pocillo de una placa de termociclador de 96 pocillos (Costar®, N° ref. 6509), combine 15 µl de la mezcla adecuada de sondas con 5 µl del producto de PCR específico de locus. Nota: Los Kits A eRES, B eRes y DRB1 eRES requieren dos pocillos por muestra, uno para la mezcla de sondas de eRES y otro para la mezcla de sondas estándar. Las mezclas de sondas eRES y estándar no tienen que obtenerse en el mismo proceso. Ambas mezclas de sondas se requieren para obtener los resultados de eRES de estos kits. Cuando se vierta la mezcla de sondas a más de 10 pocillos, agite en vórtex con cuidado cada mezcla de sondas después de cada grupo de diez. Selle la placa con cinta de polietileno (Costar® No. 6524).
- Coloque la estera de compresión de silicona encima de la placa antes de la hibridación.
- Hibride las muestras en las condiciones de incubación siguientes
 - A 97 °C durante 2 minutos
 - A 47 °C durante 10 minutos
 - A 56 °C durante 8 minutos
 - MANTENER A 56 °C.
- Asegúrese de que el láser de detección del equipo Luminex® esté encendido durante por lo menos 30 minutos antes de que concluya la hibridación.
- Mientras las muestras hibridan, prepare una mezcla al 200:1 de solución diluyente y PE-estreptavidina. Combine 170 µl de solución diluyente (DS) y 0,85 µl de 1mg/mL PE-estreptavidina (SA-PE) por muestra. Se recomienda preparar una cantidad de mezcla de solución diluyente suficiente para n+1 muestras, con objeto de cubrir las pérdidas por pipeteo.
- Mantenga la mezcla de solución diluyente y PE-estreptavidina en la oscuridad y a temperatura ambiente. ¡La PE-estreptavidina es fotosensible! La solución diluyente puede ser calentada a 45°C durante 5 minutos y agitada en vórtex ni bien llega al laboratorio, para garantizar que todos los componentes estén disueltos. Antes de preparar la mezcla, la solución diluyente debe estar a temperatura ambiente (18-30 °C). Prepárela antes de su uso y deseche toda la que no haya utilizado.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SSO, LUMINEX®.	POE-012-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	65	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

11. En el paso final a 56 °C, y estando la bandeja en el termociclador, diluya cada muestra con 170 µl de la mezcla preparada de solución diluyente y PE-estreptavidina. Es fundamental diluir todas las muestras en un espacio de tiempo no superior a 5 minutos (siguiendo el paso de MANTENER 8 minutos a 56°C).
12. Saque del termociclador la bandeja de muestras y colóquela en el Luminex® Instrument.

REPORTE DE RESULTADOS

El Software MATCH IT!™ DNA se ha diseñado como complemento para el análisis con los Kits de Tipificación por SSO LIFECODE. La tipificación de las muestras puede realizarse como sigue:

Los archivos CSV generados pueden abrirse y los datos pueden procesarse con los programas habituales de hojas de cálculo como Microsoft Excel, Lotus 123, Corel Quattro Pro o similares. El análisis consta de las etapas siguientes:

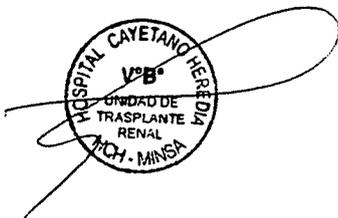
- Compruebe que se cumple el número mínimo de eventos para cada SSO en cada muestra. Esta información se encuentra en la sección DataType: Count del archivo CSV.
- Compruebe que, en cada muestra, los valores de las sondas de consenso superan la intensidad de fluorescencia mediana mínima correspondiente (MFI). Los umbrales mínimos son específicos de cada lote y figuran en la tabla de umbrales.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular, el personal que trabaje en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal, deberá estar capacitado debidamente y leer obligatoriamente este POE.

REFERENCIA

1. Olerup, H Zetterquist HLA DR typing by PCR amplification sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient transplantation Tissue Antigens 1992: 39: 225-235.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SBT, SECUENCIAMIENTO.	POE-013-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG. 66		APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Realizar el tipaje molecular HLA de los Loci; A, B y DRB1 (alta resolución), por PCR y secuenciamiento mediante el método de Sanger, utilizando el analizador genético Applied Biosystem 3500, procedimiento a seguir por el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM).

Fundamento PCR-SBT

Se aísla el ADN de a partir de sangre periférica, se amplifica diferentes exones de los genes HLA-A, -B y -DRB1, para los genes HLA de clase I; se amplifican los exones 2, 3 y 4, mientras que para los genes HLA de clase II; se amplifica los exones 2 y 3. Luego el producto amplificado es secuenciado mediante un segundo PCR, pero esta vez con nucleótidos modificados o de terminación llamados ddNTPs marcado con fluorescencia, el resultado es analizado en un equipo "Analizador Genético" AB3500, mediante una electroforesis capilar, el cual los fragmentos son detectados mediante un láser generando un electroferograma de secuencia del ADN, que luego con el uso de programas específicos se compara la secuencia con una biblioteca de secuencias de los alelos HLA y se asignan los tipajes HLA correspondientes.

ALCANCE

Inicia desde la extracción del ADN de la muestra de sangre, hasta la emisión del resultado correspondiente al tipaje HLA del paciente. Aplica para muestras de pacientes ambulatorios, particulares, hospitalizados y de emergencia que acuden al Hospital Cayetano Heredia (HCH) y requieran tipificación HLA.

RESPONSABILIDAD

Biólogo Molecular.

DEFINICIONES

- ADN (Ácido desoxiribonucleico): Ácidos nucleicos de los cromosomas, que contiene la información genética codificada.
- HLA: Refiere al Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano, importante para la actividad inmune e importante en el pronóstico para la sobrevivencia de trasplantes alogénicos.
- Genes HLA de clase I y -II: Corresponde a las secuencias génicas de HLA clase I y II que se encuentran en el cromosoma 6 y que pueden ser A, B, C y DRB1 respectivamente.
- Locus. Localización exacta de un gen en un cromosoma. Plural: loci.
- Trasplante heterólogo Es aquel realizado entre individuos diferentes pero de la misma especie. Este puede ser emparentado o no emparentado. El trasplante requiere necesariamente de la determinación de la compatibilidad entre el donante y el receptor a través del estudio de los genes HLA.
- Tipaje HLA alta resolución: Basada en secuenciación de ADN y que define el grupo alélico, la proteína específica que codifica, llegando a veces a discriminar sinónimos e



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SBT, SECUENCIAMIENTO.	POE-013-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	67	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

incluso regiones no codantes (de 4 a 8 dígitos de resolución), por ejemplo, HLA-A*02:03.

- Método de Sanger: Método de secuenciación por dideoxinucleótidos (ddNTPs) que son nucleótidos que truncan la amplificación del ADN para obtener amplificados de diferentes tamaños. Los ddNTPs están marcados con fluorocromos para su identificación.
- Secuenciación: Método de Biología Molecular que analiza fragmentos o amplificados de PCR, por detección de A, T, C o G marcadas. Método de máxima resolución molecular en el análisis de ADN.

CONDICIONES GENERALES

- Las muestras de sangre humana, deben obtenerse en tubos al vacío que contenga como anticoagulantes Ácido Cítrico - Dextrosa (ACD) o EDTA. NO heparina ya que esta puede inhibir la amplificación por PCR.
- La concentración de la muestra de ADN extraído debe ser aproximadamente 50 ng/uL. El OD 260/280 debe estar entre 1.7 y 1.9.
- Los reactivos deben ser mantenidos entre 4 y - 20.°C.
- Debe mantenerse un flujo UNIDIRECCIONAL, desde el área de pre-PCR hacia el área de post-PCR NUNCA en sentido contrario.
- Cada área debe tener sus propias micropipetas y puntas con filtro estériles evitando contaminación con amplicones.
- Método a utilizar es de Biología Molecular.

MATERIALES

- Array de 8 capilares de 50 cm para Analizador Genético.
- Placas ópticas para secuenciación de 96 pocillos.
- Tapas individuales para placas ópticas.
- Tubos de 0.5 mL
- Tubos de PCR 0,2 mL en tiras de 8.
- Agua grado biología Molecular estéril.
- Sistema para electroforesis E-gel®, gel de agarosa al 2 %.
- Septas para placas de secuenciación.
- Septas para Ánodo Buffer.
- Septas para Cátodo Buffer.
- Hoja de sellado para las placas de PCR.
- Tubos de microcentrifuga de 2 y 1.5 mL,
- Micropipetas ajustables para dispensar 10-100 uL y 100-1,000 uL y puntas desechables.
- Cronómetro.

EQUIPOS

- Cabina de Flujo Laminar, Clase II.
- Termociclador para placas (96 pocillos), SenseQuest, Labcycler®



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SBT, SECUENCIAMIENTO.	POE-013-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PAG.	68	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Microcentrifuga de tubos de 1.5-2 mL.
- Secuenciador o Analizador Genético de 8 capilares.
- Fuente de alimentación para electroforesis (E-gel® iBase™ Power System).
- Transiluminador UV.
- Refrigeradora 4°C.
- Congeladora -20°C.
- Hot plate.
- Vortex.

REACTIVOS

- SeCore® Locus A, Single Amplification System 25 reacciones. Ref. N°5300925
- SeCore® Locus B, Single Amplification System 25 reacciones. Ref. N°5300925D
- SeCore® Locus DRB1, Single Amplification System 25 reacciones. Ref. N° 5330925
- FastStart™ Taq DNA Polimerasa (5 U/pl)
- ExoSAP-IT™.
- POP-7 para Analizador Genético.
- Ánodo Buffer.
- Cátodo Buffer.
- HiDi Formamida.
- Kit estándar de secuenciación.
- Reactivo de acondicionamiento para Analizador Genético.
- Agua ultra pura para secuenciación.
- Etanol absoluto.
- Agarosa.
- Marcadores de peso molecular, para cubrir un rango de 50 a 2000 pb.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

El ADN a ser tipificado ha sido purificado y cuantificado siguiendo el POE-002-02, previamente para alcanzar el nivel mínimo de pureza y concentración que requiere la prueba.

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

No Aplica.

CALIBRACION DEL EQUIPO.

Se debe activar el equipo Analizador Genético AB3500 por 30 minutos antes de utilizarlo, para que el láser se caliente y se estabilice.

Proveedores realizan la calibración, actualización de programas y mantenimiento de equipo.

CONTROL DE CALIDAD

El ensayo se debe llevar a cabo según las recomendaciones del prospecto, así como según otros procedimientos de control de calidad que cumplen con las especificaciones locales, estatales, federales y/o de las agencias certificadoras.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SBT, SECUENCIAMIENTO.	POE-013-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	69	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Cuando se desea emplear un reactivo o equipo que no figura en la lista de los recomendados por el fabricante es necesario llevar a cabo una validación previa del mismo empleando muestras con perfiles ya conocidos.

PROCEDIMIENTO

PURIFICACION DEL ADN GENOMICO.

La Purificación del ADN genómico se puede hacer con un método de su elección; la concentración final debe estar comprendida entre 10 y 200 ng/μl. En caso necesario, ajuste con agua exenta de nucleasas (ver POE-002-02).

AMPLIFICACION DEL LOCUS ESPECÍFICO

1. Atemperar los Amp mixes de PCR para los locus A, B, C y DRB1 que presentan los kits.
2. Agitar de 2 a 3 veces en un vortex los Amp mixes. Se sugiere realizar las mezclas para varias reacciones, según se detalla en las tablas N°01 (Clase I) y tabla N°02 (Clase II):

Tabla N°01

Class I	n = Number of Sample			
	n = 5	n = 10	n = 15	n = 25
Amp Mix [(n+1 reactions) x 19.8]	118.8 μl	217.8 μl	316.8 μl	514.8 μl
FastStart™ Taq [(n+1 reactions) x 0.2]	1.2 μl	2.2 μl	3.2 μl	5.2 μl

Tabla N°02

Class II	n = Number of Sample			
	n = 5	n = 10	n = 15	n = 25
Amp Mix [(n+1 reactions) x 22.8]	136.8 μl	250.8 μl	364.8 μl	592.8 μl
FastStart™ Taq [(n+1 reactions) x 0.2]	1.2 μl	2.2 μl	3.2 μl	5.2 μl

3. Luego de dispensar los Amp mixes, añadir 5 uL de ADN (15-30 ng/uL) a los tubos de reacción. Añadir 5uL de agua estéril para la reacción de control negativo.
4. Cubrir los tubos, y centrifugar brevemente.
5. Encender el termociclador de PCR y programar el equipo bajo las siguientes condiciones:

Pasos	Temp. (C°)	Tiempo (seg)	Acción
1 ciclo	95	240	Denaturar
35 ciclos	95	20	Denaturar
	63	20	Hibridación
	72	40	Extensión
1 ciclo	72	300	Extensión
Mantener	4	∞	Mantener

6. Después del PCR, añadir 5uL del producto de PCR en un gel de agarosa al 2%.
Obteniéndose los siguientes productos de PCR:



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SBT, SECUENCIAMIENTO.	POE-013-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	70	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Locus A (990-1,100 pb) aprox.
- Locus B (950-1,400 pb) aprox.
- Locus C (1,375 pb) aprox.
- Locus DRB1 (300 pb) aprox.

7. Verificar que exista un amplificado único y definido para cada tubo de PCR, excepto para el control negativo.

PURIFICACION DE AMPLICONES CON EXO-SAP®

1. Añadir 4 uL de ExoSAP-IT a cada tubo de amplificado.
2. Cerrar el tubo de PCR y agitar por 5 segundos.
3. Centrifugar a máxima velocidad por 5 segundos.
4. Colocar en el termociclador y programarlo de la siguiente manera

Pasos	Temp. (C°)	Tiempo (min)	Acción
1 ciclo	37	20	Digestión enzimática
	80	20	Digestión enzimática
1 ciclo	4	∞	Mantener

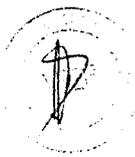
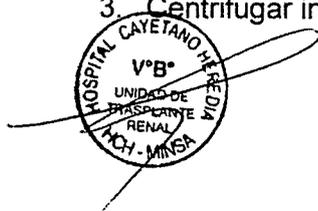
REACCION DE SECUENCIACION

1. Luego de la digestión de la exonucleasa y fosfatasa con EXO-SAP de los productos de PCR, centrifugar a máxima velocidad por 5 segundos.
2. Tomar 2 uL del amplicon con Exo-SAP (tanto A, B y/o C) y colocar en tubos rotulados de la siguiente manera:
Exon2 forward, Exon2 reverse,
Exon3 forward, Exon3 reverse
Exon4 forward, Exon4 reverse
3. Para el locus DRB1 de clase II, tomar 2 uL del amplicon con Exo-SAP, previa dilución 1/20 con agua libre de nucleasas.
Exon2 forward, Exon2 reverse
4. Adicionar 8 uL del Mix Locus Específico (Tanto para A, B, C y DRB1) según corresponda).
5. Vortex por 5 segundos, Centrifugar a máxima velocidad por 5 segundos.
6. Colocar los tubos en el termociclador y programarlo de la siguiente manera:

Pasos	Temp. (C°)	Tiempo (seg)	Acción
25 ciclos	95	20	Denaturar
	50	15	Hibridación
	60	60	Extensión
Mantener	4	∞	Mantener

PRECIPITACION

1. Dar un golpe de centrifuga por 5 segundos.
2. Añadir 2 uL de tampón PPT. NO AGITAR.
3. Centrifugar inmediatamente a máxima velocidad por 5 segundos.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	TIPIFICACION MOLECULAR HLA CLASE I Y II POR PCR-SBT, SECUENCIAMIENTO.	POE-013-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	71	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

4. Adicionar 40 uL de etanol absoluto, grado biología molecular.
5. Vortex o agitar por 60 segundos.
6. Centrifugar suavemente a 500G, golpe de centrifuga.
7. Pasar el contenido de los tubitos de PCR, en una placa óptica para secuenciamiento.
8. Centrifugar a 2200xG por 40 minutos.
9. Tomar la placa e invertir sobre un papel absorbente e inmediatamente centrifugar a 500xG por 60 segundos.
10. Añadir 100 uL de etanol al 70% a cada tubo. NO AGITAR.
11. Centrifugar a 2200xG por 10 minutos.
12. Tomar la placa e invertir sobre un papel absorbente e inmediatamente centrifugar a 500xG por 60 segundos.
13. Añadir 15 uL de HiDi Formamida a cada tubo.

ANALISIS DE AMPLIFICADOS EN ANALIZADOR GENETICO

1. Denaturar a 95°C por 2 minutos.
2. Colocar la placa en el Analizador Genético o Secuenciador.
3. Asignar los alelos con el programa UType SBT HLA®.
4. En caso de ambigüedades en la asignación de alelos se procederá a la amplificación específica de los alelos, Utilizando el reactivo recomendado por el programa UType SBT HLA®.

REPORTE DE RESULTADOS

Se recogerá la información proporcionada por el Analizador Genético y posteriormente se interpretara en el software UType SBT HLA®.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular, el personal que trabaje en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal, deberá estar capacitado debidamente y leer obligatoriamente este POE.

REFERENCIA

1. Instrucciones del fabricante. SeCore Equipos de secuenciación
<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.htm>
<http://www.thermofisher.com/pe/en/home/brands/applied-biosystems.html>
<https://www.onelambda.com/en/product/secore-sbt.html>



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: HEMATOXILINA-EOSINA	POE-014-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	72	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Tinción de las diferentes estructuras histológicas acidófilas y basófilas en biopsias renales para su posterior observación con el microscopio óptico.

ALCANCE

Inicia desde el corte en el micrótopo de rotación de los bloques de parafina que contiene la biopsia renal fijada en formol tamponado, su respectiva tinción con la Hematoxilina & Eosina (H-E), llamado también colorante universal por tener radicales básicos y ácidos. Concluye el proceso hasta la entrega de la lámina coloreada al Patólogo.

RESPONSABILIDAD

Tecnólogo/Técnico especializado en Laboratorio.

DEFINICIONES

- **Colorantes Básicos:** La hematoxilina es un colorante básico porque contiene sales en las que la base aporta el color, mientras que la parte ácida es incolora. Tienen apetencia por sustancias ácidas del tejido como el ADN o ciertos componentes de la matriz extracelular. Así, ponen de manifiesto el núcleo y el ARN, sobre todo el ARNr presente en los ribosomas por ser muy abundante, así como ciertas matrices extracelulares ricas en componentes ácidos.
- **Colorantes Ácidos:** La eosina es un colorante ácido porque contiene sales con el anión coloreado y la base incolora. Tienen apetencia por sustancias básicas, sobre todo estructuras proteicas localizadas en el citoplasma celular y también el colágeno de la matriz extracelular.
- **Micrótopo de Rotación:** Es el micrótopo más empleado. La cuchilla es relativamente pequeña permaneciendo en una posición muy peligrosa (con el filo hacia arriba). No conviene para cortar bloques grandes.

CONDICIONES GENERALES

- Las superficies de los bloques deben estar alineados, por lo que es necesario desgastar para obtener cortes completos de la biopsia renal.
- Se deben usar láminas portaobjetos de vidrio
- Método a utilizar es de coloración manual.

MATERIALES

- Agua corriente
- Agua destilada
- Xilol
- Alcohol
- Bálsamo de Canadá.
- Cubetas de vidrio
- Canastilla porta laminas
- Lamina portaobjetos
- Laminilla cubreobjetos
- Lápiz diamante



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: HEMATOXILINA-EOSINA	POE-014-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	73	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

EQUIPOS

- Micrótopo de rotación
- Flotador de tejidos
- Estufa secadora
- Incubadora
- Microscopio óptico

REACTIVOS

- Eosina.
- Hematoxilina.
- Agua destilada.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

- El fijador de tejido más usado es el formaldehído al 10% tamponado neutro.
- Se realiza cortes en blanco del bloque de parafina.
- El grosor de corte óptimo de las muestras es de 3 micrómetros.

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

El colorante se prepara cada dos semanas.

CALIBRACION

No Aplica.

CONTROL DE CALIDAD

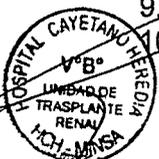
Previa entrega al patólogo se verificará mediante el microscopio de luz, la calidad de la lámina coloreada observando que los núcleos son de color azul/ negro, los eritrocitos de color naranja a rosado y las estructuras restantes de color rosado a rojizo.

LIMITACIONES

- El colorante preparado tiene tiempo de duración de 2 semanas
- La mala fijación del tejido es la causa más común de una tinción inadecuada
- El exceso o defecto de la oxidación de la hemateína o de diferenciación de la coloración y el empleo de una hematoxilina vieja o utilizada excesivamente.

PROCEDIMIENTO

1. Se rotula la lámina con el lápiz de diamante y se realiza los cortes del bloque de parafina de 3 mieras y se coloca en el flotador de tejidos.
2. Se impregna el tejido a la lámina portaobjeto
3. Se desparafina colocando la lámina en la estufa entre 50 a 60°C durante dos horas.
4. Colocar la lámina en cubeta de xileno por 10 minutos, hacer 2 pases.
5. Se coloca en alcoholes de 100%, 95% y 70% por 5 minutos cada uno.
6. Hidratar con agua destilada por 2 a 3 minutos, agitar suavemente.
7. Agregar y cubrir el tejido con hematoxilina por 5 minutos
8. Lavar en agua corriente por 5 minutos
9. Sumergir en alcohol ácido.
10. Lavar en agua destilada por 3 minutos.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V	
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: HEMATOXILINA-EOSINA		POE-014-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	74	APROBADO	Zegarra Montes, L	

LHBM-UTR rev..02

11. Sumergir en agua amoniaca.
12. Agregar y cubrir el tejido con eosina, sumergir la lámina y sacar inmediatamente.
13. Deshidratar con alcoholes de 100%, 95% y 70% por 30 segundos.
14. Aclarar con xileno por 10 segundos, hacer 2 pases
15. Hacer el montaje con una gota de Bálsamo de Canadá y colocar la laminilla cubreobjetos.
16. Verificar en el microscopio de luz.
17. Entregar al patólogo.

REPORTE DE RESULTADOS

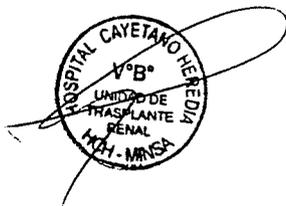
Por ser una tinción universal, ya que colorea todas las estructuras renales, el reporte anatomico-patológico es descriptivo en cuanto a la morfología de cada estructura histológica evaluada como número de glomérulos, grado de inflamación intersticial, Tubulitis, Capilaritis, esclerosis global, número de vasos arteriales; los cuales serán vistos de manera más específica con las coloraciones especiales: PAS, Tricrómica y Jones.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de técnicas histopatológicas, el personal que trabaje en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal (UTR) deberá leer obligatoriamente este POE. Asimismo, el manejo de este proceso se requiere de personal con experiencia en el manejo de coloraciones especiales, bajo la supervisión del personal encargado.

REFERENCIA

1. Técnicas Histológicas. Universidad de Los Andes. 2012.
2. Manual de procedimientos y técnicas histológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 2011
3. Carson, Freida L.; Hladik, Christa. Histotechnology: A Self-Instructional Text. 3ª edición. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press. 2009.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: TINCIÓN PAS	POE-015-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	75	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev..02

OBJETIVO

Tinción de estructuras histológicas renales tales como las membranas basales glomerulares, tubulares y la matriz mesangial, ya que estas son ricas en colágeno tipo IV, proteoglicanos y glicoproteínas.

ALCANCE

Inicia desde el corte en el micrótopo de rotación de los bloques de parafina que contiene la biopsia renal fijada en formol tamponado, su respectiva tinción hasta la entrega de la lámina coloreada al patólogo.

RESPONSABILIDAD

Tecnólogo/Técnico especializado en Laboratorio.

DEFINICIONES

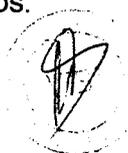
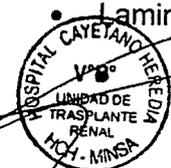
- **Técnica de Schiff:** La técnica del ácido Peryódico de Schiff (PAS), es una reacción colorimétrica usada comúnmente en Histoquímica. Es de amplia aplicación en el diagnóstico histopatológico rutinario. Puede colorear numerosos componentes bioquímicos (hidratos de carbono o sustancias relacionadas con ellas). No es una coloración, su principio se basa en una serie de reacciones químicas entre el tejido y los reactivos usados. El reactivo PAS, consiste en oxidar los tejidos mediante el ácido peryódico para incrementar el número de grupos carbonilos (aldehídos o cetonas) presente en ellos, de forma que puedan ser demostrados posteriormente por el reactivo de Schiff. El ácido peryódico es un oxidante selectivo, ya que oxida algunas sustancia químicas. Así podemos deducir que a través de este oxidante, el tejido es preparado por medio de una oxidación, la cual actúa sobre los azúcares que lo contienen y los convierten en aldehídos, es cuando actuaría el reactivo de Schiff.
- **Micrótopo de Rotación:** Es el micrótopo más empleado. La cuchilla es relativamente pequeña permaneciendo en una posición muy peligrosa (con el filo hacia arriba). No conviene para cortar bloques grandes.

CONDICIONES GENERALES

- Las superficies de los bloques deben estar alineados, por lo que es necesario desgastar para obtener cortes completos de la biopsia renal.
- Se deben usar láminas portaobjetos de vidrio
- Método a utilizar es de coloración manual.

MATERIALES

- Agua corriente.
- Agua destilada.
- Xilol.
- Alcohol.
- Bálsamo de Canadá.
- Cubetas de vidrio.
- Canastilla porta láminas.
- Lámina portaobjetos.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACION ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: TINCIÓN PAS	POE-015-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	76	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Laminilla cubreobjetos.
- Lápiz diamante.

EQUIPOS

- Micrótopo de rotación.
- Flotador de tejidos.
- Estufa.
- Microscopio de luz.

REACTIVOS

- Ácido Peryódico 0,5%.
- Reactivo de Schiff.
- Ácido sulfúrico.
- Hematoxilina (Harris, Mayer) o Van Gieson o Naranja G para contrastar.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

- El fijador de tejido más usado es el formaldehído al 10% tamponado neutro.
- Se realiza cortes en blanco del bloque de parafina.
- El grosor de corte óptimo de las muestras es de 3 micrómetros.

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

El colorante se prepara cada dos semanas.

CALIBRACION

No Aplica.

CONTROL DE CALIDAD

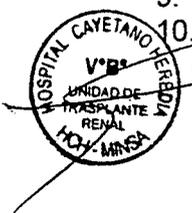
Previa entrega al patólogo se verificará mediante el microscopio de luz, la calidad de la lámina coloreada observando que el glucógeno, mucinas y algunas membranas basales sean de color rojo magenta a fucsia y los núcleos azules.

LIMITACIONES

El colorante preparado tiene tiempo de duración de 2 semanas.

PROCEDIMIENTO

1. Se rotula la lámina con el lápiz de diamante y se realiza los cortes del bloque de parafina de 3 micrómetros y se coloca en el flotador de tejidos.
2. Se impregna el tejido a la lámina portaobjeto.
3. Se desparafina colocando la lámina en la estufa entre 50 a 60°C durante dos horas.
4. Colocar la lámina en cubeta de xileno por 10 minutos, hacer 2 pases.
5. Se coloca en alcoholes de 100%, 95% y 70% por 5 minutos cada uno.
6. Hidratar con agua destilada por 2 a 3 minutos.
7. Agregar y cubrir el tejido con ácido peryódico al 0.5% por 15 minutos.
8. Lavar en agua corriente por 5 minutos.
9. Lavar en agua destilada por 3 minutos.
10. Agregar y cubrir el tejido con reactivo de Schiff por 10 a 15 minutos
11. Lavar en agua corriente por 5 minutos.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: TINCIÓN PAS	POE-015-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	77	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

11. Lavar en agua destilada.
12. Agregar Hematoxilina por 3 a 5 minutos.
13. Lavar en agua corriente durante 5 minutos.
14. Deshidratar con alcoholes de 100%, 95% y 70%.
15. Aclarar con xileno por 30 segundos.
16. Hacer el montaje con una gota de Bálsamo de Canadá y colocar la laminilla cubreobjetos.
17. Verificar en el microscopio de luz.
18. Entregar al patólogo.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

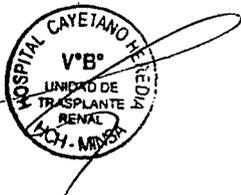
- **Membranas basales glomerulares, tubulares y la matriz mesangial:** Color magenta o fucsia.
Además, también son PAS positivos: los glomérulos esclerosados. También se puede evidenciar morfológicamente con esta técnica los dobles contornos en paredes de capilares glomerulares que se pueden ver en rechazo humoral crónico.
- **Núcleos celulares:** Color azul.
El contraste con el fucsia de esta coloración permite valorar mejor los elementos inflamatorios de núcleo azul en casos de tubulitis, capilaritis y glomerulitis para poder realizar una mejor determinación del Banff para clasificar el rechazo post-trasplante.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de técnicas histopatológicas, el personal que trabaje en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal (UTR) deberá leer obligatoriamente este POE. Asimismo, el manejo de este proceso se requiere de personal con experiencia en el manejo de coloraciones especiales, bajo la supervisión del personal encargado.

REFERENCIA

1. Técnicas Histológicas. Universidad de Los Andes. 2012.
2. Manual de procedimientos y técnicas histológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 2011.
3. Carson, Freida L.; Hladik, Christa. Histotechnology: A Self-Instructional Text. Three edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press. 2009.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: TRICRÓMICA DE MASSON	POE-016-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	78	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Visualizar claramente en el tejido renal las fibras de colágeno tipo IV, que son proteínas fibrilares que forman las fibras gruesas o haces, que están diseñados para dar resistencia; y en menor intensidad las fibras reticulares.

ALCANCE

Inicia desde el corte en el micrótopo de rotación de los bloques de parafina que contiene la biopsia renal fijada en formol tamponado, su respectiva tinción de Tricrómica de Masson hasta la entrega de la lámina coloreada al Patólogo.

RESPONSABILIDAD

Tecnólogo/Técnico especializado en Laboratorio.

DEFINICIONES

- **Tinción tricrómica de Masson:** Este método fue modificado (Mallory) y utiliza azul de anilina y ácido fosfotúngstico. El fundamento de estas tinciones depende de varios factores, como la permeabilidad: el colágeno y los otros elementos acidófilos, la interacción del colorante en la estructura, que genera un gradiente de penetración distinto para cada grupo de colorantes, responsable de la diferente coloración de cada estructura; por ello los colorantes utilizados para las diferentes tinciones tricrómicas. Todos los elementos acidófilos del tejido tales como el citoplasma, el músculo y el colágeno se unirán a los tintes ácidos como el escarlata de Biebrich, los ácidos fosfotúngsticos y fosfomolibdicos permiten que la escarlata de Biebrich difunda del colágeno pero no del citoplasma y probablemente actúen como medio de unión entre el colágeno y el azul de anilina, que es el tinte del colágeno.
- **Micrótopo de Rotación:** Es el micrótopo más empleado. La cuchilla es relativamente pequeña permaneciendo en una posición muy peligrosa (con el filo hacia arriba). No conviene para cortar bloques grandes.

CONDICIONES GENERALES

- Las superficies de los bloques deben estar alineados, por lo que es necesario desgastar para obtener cortes completos de la biopsia renal.
- Se deben usar láminas portaobjetos de vidrio.
- Método a utilizar es de coloración manual.

MATERIALES

- Agua corriente.
- Agua destilada.
- Xilol.
- Alcohol.
- Bálsamo de Canadá.
- Cubetas de vidrio.
- Canastilla porta láminas.

Lamina portaobjetos.

Laminilla cubreobjetos.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: TRICRÓMICA DE MASSON	POE-016-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	79	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Lápiz diamante.

EQUIPOS

- Micrótopo de rotación.
- Flotador de tejidos.
- Estufa.
- Microscopio óptico.

REACTIVOS

- Hematoxilina Férrica de Weigert.
- Ácido Fosfomolibdico.
- Escarlata de Biebrich-Fucsina.
- Azul de anilina.
- Ácido acético.
- Solución de Bouin.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

- Si bien cualquier fijador de tejido es válido, el más común formaldehido al 10%, de elección es la solución de Bouin.
- Se realiza cortes en blanco del bloque de parafina.
- El grosor de corte óptimo de las muestras es de entre 3 a 5 micrómetros.

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

El colorante se prepara cada dos semanas.

CALIBRACION

No Aplica.

CONTROL DE CALIDAD

Previa entrega al patólogo se verificará mediante el microscopio óptico, la calidad de la lámina coloreada observando que los núcleos son de color lila a marrón, los eritrocitos, músculo, fibrina y citoplasma son de color rojo; y el colágeno, fibras de reticulina, amiloide y moco son de color azul.

Cualquier tejido con componente conjuntivo, en especial con contenido en fibras colágenas, puede servir como control.

LIMITACIONES

- El colorante preparado tiene tiempo de duración de 2 semanas.
- La mala fijación del tejido es la causa más común de una tinción inadecuada.

PROCEDIMIENTO

1. Se rotula la lámina con el lápiz de diamante y se realiza los cortes del bloque de parafina de 3 micrómetros y se coloca en el flotador de tejidos.
Se impregna el tejido a la lámina portaobjeto.
Se desparafina colocando la lámina en la estufa entre 50 a 60°C durante dos horas.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: TRICRÓMICA DE MASSON	POE-016-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	80	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

4. Colocar la lámina en cubeta de xileno por 5 minutos, hacer 3 pases.
5. Se coloca en alcoholes de 100%, 95% y 70% por 5 minutos cada uno.
6. Hidratar con agua destilada por 2 a 3 minutos, agitar suavemente.
7. Incubar por 24 horas en Solución de Bouin.
8. Agregar y cubrir el tejido con hematoxilina férrica de Weigert por 10 a 15 minutos.
9. Lavar en agua corriente por 3 minutos.
10. Sumergir en alcohol ácido por 30 segundos.
11. Lavar en agua corriente por 10 minutos.
12. Enjuagar en agua destilada por 2 minutos hacer 2 pases.
13. Agregar y cubrir el tejido con Escarlata de Biebrich-Fucsina por 5 a 15 minutos.
14. Enjuagar en agua destilada por 2 minutos.
15. Agregar y cubrir el tejido con Ácido fosfomolibdico al 1% por 10 a 15 minutos.
16. Enjuagar en agua destilada por 2 minutos.
17. Agregar y cubrir el tejido con azul de anilina por 5 a 10 minutos.
18. Enjuagar con agua destilada y dejar escurrir.
19. Sumergir en ácido acético por 1 a 3 minutos.
20. Deshidratar con alcoholes del 70%, 95% y 100% por 3 minutos.
21. Aclarar con xileno por 8 minutos hacer 2 pases.
22. Hacer el montaje con una gota de Bálsamo de Canadá y colocar la laminilla cubreobjetos.
23. Verificar en el microscopio de luz.
24. Entregar al patólogo.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

- **Fibras colágenas, fibras de reticulina, amiloide y moco:** Color azul.
Además, la fibrosis intersticial y subintimal arteriolar vistos en nefropatía crónica del injerto y rechazo humoral crónico también se visualizan color azul. Otros como la esclerosis glomerular global y segmentaria; y las adherencias o lesiones tip vistos en la glomeruloesclerosis focal y segmentaria también se ponen de manifiesto con esta coloración.
- **Estructuras oxidadas, queratina, músculo, eritrocitos y citoplasma:** Color rojo.
Asimismo, también se ven de color rojo los trombos glomerulares en caso de rechazo hiperagudo y los depósitos subendoteliales glomerulares en caso de glomerulopatías.
- **Núcleo celular:** Color lila-marrón.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de técnicas histopatológicas, el personal que trabaje en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal (UTR) deberá leer obligatoriamente este POE. Asimismo, el manejo de este proceso se requiere de personal con experiencia en el manejo de coloraciones especiales, bajo la supervisión del personal encargado.

REFERENCIA

1. Técnicas Histológicas. Universidad de Los Andes. 2012.
2. Manual de procedimientos y técnicas histológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 2011
3. García del Moral, Raimundo. Laboratorio de Anatomía Patológica. Ed. Interamericana Mc Graw Hill, 1ª Edición. 1993.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: TINCIÓN PLATA METENAMINA JONES	POE-017-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	81	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Visualizar detalles extremadamente finos como las membranas basales glomerulares y tubulares de biopsias renales.

ALCANCE

Inicia desde el corte con el micrótopo de rotación de los bloques de parafina que contiene la biopsia renal fijada en formol tamponado, su respectiva tinción con la plata metenamina de Jones hasta la entrega de la lámina coloreada al médico patólogo.

RESPONSABILIDAD

Técnico/Tecnólogo especializado en Laboratorio.

DEFINICIONES

- **Tinción de Jones:** Es una tinción de metenamina plata asociado a Ácido peryódico de Schiff que tiñe membranas basales permitiendo visualizar mejor la membrana glomerular, en algunos casos "espinada" (spikes) visto en la glomerulonefritis membranosa. Este tipo de tinción es importante especialmente para revelar la ubicación de proteínas (por ejemplo colágeno tipo III) y ADN. Es utilizada para demostrar ambos tipos de sustancia tanto dentro como fuera de las células. Algunas células son *argentafines*. Estas reducen las soluciones del catión plata (Ag^+) a plata metálica luego de ser fijadas con formalina. Otras células son *argirofilicas*. Estas reducen las soluciones del catión plata a plata metálica luego de ser expuestas a un colorante que contengan un agente reductor, como la hidroquinona o formalina. La tinción argéntica se utiliza en microscopía óptica. Las partículas de plata metálica se depositan en las fibras de reticulina sensibilizadas y son fácilmente observables en los preparados microscópicos.
- **Micrótopo de Rotación:** Es el micrótopo más empleado. La cuchilla es relativamente pequeña permaneciendo en una posición muy peligrosa (con el filo hacia arriba). No conviene para cortar bloques grandes.

CONDICIONES GENERALES

- Las superficies de los bloques deben estar alineados, por lo que es necesario desgastar para obtener cortes completos de la biopsia renal.
- Se deben usar láminas portaobjetos de vidrio y nuevas
- Método a utilizar es de coloración manual.

MATERIALES

- Agua corriente.
- Agua destilada.
- Xilol.
- Alcohol.
- Bálsamo de Canadá.
- Cubetas de vidrio.
- Canastilla porta láminas.
- Lamina portaobjetos.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: TINCIÓN PLATA METENAMINA JONES	POE-017-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	82	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Laminilla cubreobjetos.
- Lápiz diamante.

EQUIPOS

- Micrótopo de rotación.
- Flotador de tejidos.
- Estufa.
- Microscopio óptico.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

- Se realiza cortes en blanco del bloque de parafina.

REACTIVOS

- Ácido peryódico al 0.5%.
- Solución de Plata - Metenamina.
- Cloruro de oro.
- Tiosulfato sódico o hiposulfito sódico.
- Hematoxilina de Mayer.
- Eosina.

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

No aplica.

CALIBRACION.

No aplica.

CONTROL DE CALIDAD

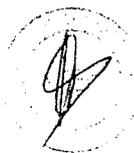
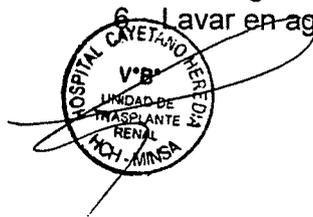
- Previa entrega al patólogo se verificará mediante el microscopio de luz, las membranas basales de los glomérulos que deben ser de color negro y definido el citoplasma de los túbulos deben ser de color rosado.

LIMITACIONES

- El colorante se prepara cada vez que se requiera de la coloración.
- No se puede almacenar el colorante para días posteriores.
- La técnica es costosa.

PROCEDIMIENTO

1. Se rotula la lámina con el lápiz de diamante y se realiza los cortes del bloque de parafina de 3 micrómetros y se coloca en el flotador de tejidos.
2. Se impregna el tejido a la lámina portaobjeto.
3. Se desparafina colocando la lámina en la estufa entre 50 a 60°C durante dos horas.
4. Colocar la lámina en cubeta de xileno por 10 minutos, hacer 2 pases de 5. Se coloca en alcoholes de 100%, 95% y 70% por 5 minutos cada uno.
5. Sumergir en alcohol al 100%, 96% y 70% por 5 minutos.
6. Lavar en agua destilada por 5 minutos.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: TINCIÓN PLATA METENAMINA JONES	POE-017-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	83	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

7. Agregar y cubrir el tejido con ácido peryódico al 0.5% por 15 minutos.
8. Sumergir la lámina en solución de Plata- Metenamina y llevar a la estufa por 30 a 60 minutos, se controla la tinción y comprobar al microscopio óptico que se han teñido los glomérulos.
9. Lavar en agua corriente por 7 minutos.
10. Agregar cloruro de oro al 0.2% por 2 minutos.
11. Lavar en agua destilada por 2 minutos.
12. Agregar al tejido tiosulfato sódico por 5 minutos.
13. Deshidratar con alcoholes de 100%, 95% y 70% por 30 segundos.
14. Lavar en agua corriente por 3 minutos.
15. Agregar eosina por 3 minutos.
16. Sumergir en alcohol al 70%, 95% y 100%, 96% y 70% por 3 minutos.
17. Sumergir y sacar en xilol.
18. Hacer el montaje con una gota de Bálsamo de Canadá y colocar la laminilla cubreobjetos.
19. Verificar en el microscopio de luz.
20. Entregar al patólogo.

REPORTE DE RESULTADOS

Con esta tinción podemos valorar de manera más clara el desdoblamiento o doble contorno de la membrana basal de los capilares glomerulares visto en casos de glomerulopatía crónica del trasplante que sugiere rechazo crónico (mediado por anticuerpos). También se realza en la esclerosis global glomerular, y en la lesión glomerular colapsante asociado a glomérulo esclerosis global y segmentaria.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado, el personal que trabajen en el LHBM, deberá leer obligatoriamente este POE.

Asimismo, el manejo de este proceso se requiere de personal con experiencia, bajo la supervisión del personal encargado.

REFERENCIA

1. Manual de procedimientos y técnicas histológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 2011
2. Técnicas Histológicas. Universidad de Los Andes. 2012.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: ZIEHL-NEELSEN	POE-018-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	84	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Identificación de microorganismos bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en muestras de tejido renal, sin diferenciación de especies. Ésta característica hace de esta coloración un método rápido en el diagnóstico de infección micobacteriana.

ALCANCE

Inicia desde el corte en el micrótopo de rotación de los bloques de parafina que contiene la biopsia renal fijada en formol tamponado, su respectiva tinción, culminando con la entrega de la lámina coloreada al Patólogo.

RESPONSABILIDAD

Técnico/Tecnólogo especializado en Laboratorio.

DEFINICIONES

- **Coloración de Ziehl-Neelsen:** Los microorganismos BAAR son bacterias Gram positivas que resisten la decoloración con decolorantes enérgicos, como las soluciones de etanol en ácido clorhídrico (de donde deriva la denominación), solo se tiñen bien forzando la tinción (con calor como en la endospora o con una solución muy concentrada de colorante (fucsina) en fenol). El Alcohol-clorhídrico no las decolora, por lo que se observan de color rojo. Cualquier otra célula (excepto de algunas Nocardia, o endosporas) es decolorada, por lo que admite la tinción por un segundo colorante (azul de metileno).

- **Micrótopo de Rotación:** Es el más empleado. La cuchilla es relativamente pequeña permaneciendo en una posición muy peligrosa (con el filo hacia arriba). No conviene para cortar bloques grandes.

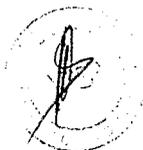
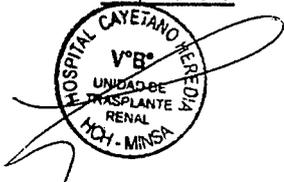
CONDICIONES GENERALES

- Las superficies de los bloques deben estar alineados, por lo que es necesario desgastar para obtener cortes completos de la biopsia renal.
- Se deben usar láminas portaobjeto de vidrio.
- Método a utilizar es de coloración manual.

MATERIALES

- Agua corriente.
- Agua destilada.
- Xilol.
- Alcohol.
- Bálsamo de Canadá.
- Cubetas de vidrio.
- Canastilla porta láminas.
- Lámina portaobjetos.
- Laminilla cubreobjetos.
- Lápiz diamante.

EQUIPOS



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: ZIEHL-NEELSEN	POE-018-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	85	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

- Micrótopo de rotación.
- Flotador de tejidos.
- Estufa.
- Microscopio de luz.

REACTIVOS

- Fucsina básica.
- Azul de Metileno.
- Fenol.
- Etanol-HCl.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

Se realiza cortes en blanco del bloque de parafina.

CONTROL DE CALIDAD

Previa entrega al Patólogo se verificará mediante el microscopio de luz, la calidad de la lámina coloreada observando que las bacterias ácido-alcohol resistente se ven de color rojo/ violeta y las no ácido alcohol resistentes de color azul.

LIMITACIONES

El colorante preparado tiene tiempo de duración de 2 semanas.

PROCEDIMIENTO

1. Se rotula la lámina con el lápiz de diamante y se realiza los cortes del bloque de parafina de 3 micrómetros y se coloca en el flotador de tejidos.
2. Se impregna el tejido a la lámina portaobjeto.
3. Se desparafina colocando la lámina en la estufa entre 50 a 60°C durante 2 horas.
4. Colocar la lámina en cubeta de xileno por 10 minutos, hacer 2 pases.
5. Se coloca en alcoholes de 100%, 95% y 70% por 5 minutos cada uno.
6. Hidratar con agua destilada por 2 a 3 minutos.
7. Agregar y cubrir el tejido con fucsina ácida y calentar hasta observar emisiones de vapor pero evitando la ebullición. Mantener caliente la preparación de 10 a 15 minutos.
8. Lavar en agua corriente por 3 minutos.
9. Decolorar con Alcohol-Clorhídrico durante 1 minuto aproximadamente o bien hasta que ya no aparezca un color rojo.
10. Lavar con agua.
11. Realizar una tinción de contraste con Azul de Metileno Fenicado de 3 a 4 minutos.
12. Lavar de nuevo con agua y secar al aire.
13. Verificar en el microscopio de luz.
14. Entregar al Patólogo.

REPORTE DE RESULTADOS

El reporte microscópico se calificará como:



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	COLORACIÓN ESPECIAL PARA BIOPSIA RENAL: ZIEHL-NEELSEN	POE-018-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	86	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

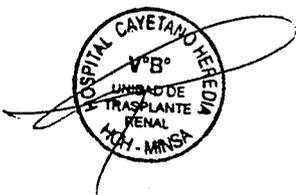
- **Tinción para BAAR (+):** De existir microorganismos de morfología bacilar que se tiñen color fucsia/magenta en un fondo azul en el tejido renal.
- **Tinción para BAAR (-):** De no evidenciarse los mismos; es decir, solo la muestra presenta color y fondo azul sin observarse microorganismos de morfología bacilar color fucsia/magenta en el tejido renal.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de técnicas histopatológicas, el personal que trabaje en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular de la Unidad de Trasplante Renal (UTR) deberá leer obligatoriamente este POE. Además, el manejo de este proceso requiere personal con experiencia en el manejo de coloraciones especiales, bajo supervisión del personal encargado.

REFERENCIA

1. Manual de Procedimientos y Técnica Histológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. 2011
2. Técnicas Histológicas. Universidad de Los Andes, 2012.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA C4d EN BIOPSIA RENAL POR CONGELACIÓN	POE-019-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	87	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

OBJETIVO

Establecer el procedimiento a seguir por el personal de Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular (LHBM) en la recepción y el procesamiento de las biopsias renales para cortes por congelación y su posterior proceso para la técnica de inmunofluorescencia indirecta para C4d.

ALCANCE

Inicia desde la recepción de la biopsia renal con PBS 1X o solución fisiológica hasta la emisión del resultado. Aplica para biopsias de pacientes ambulatorios, particulares, hospitalizados y de emergencia que acuden al Hospital Cayetano Heredia (HCH) y requieran análisis de Inmunofluorescencia para C4d.

RESPONSABILIDAD

Biólogo Molecular.

DEFINICIONES

- **Biopsia renal:** Es la extracción de tejido renal de una persona viva para su estudio microscópico, realizada para establecer el diagnóstico, determinar el estadio y pronóstico de una enfermedad renal con la finalidad de brindar un adecuado tratamiento.
- **PBS:** Es el tampón fosfato salino o buffer fosfato salino. Proveniente de las siglas en inglés "Phosphate Buffered Saline", es una solución tampón o buffer empleada en la investigación biológica, bioquímica y de inmunología diagnóstica. Es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl⁻, Na⁺, K⁺) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Es una solución isotónica, pues la concentración de soluto es igual dentro y fuera de la célula; su pH es de 7.4.
- **Suero Fisiológico:** Llamada también solución fisiológica, es una disolución acuosa de sustancias compatibles con los organismos vivos debido a sus características definidas de osmoticidad, pH y fuerza iónica. Está compuesto de agua, electrolitos y a veces de distintas sustancias tales como glucosa, carbono y energía para el organismo, y de algunos polisacáridos expansores. Se emplea como sustituto de la sangre cuando disminuye considerablemente la volemia y como vía de aplicación de sustancias diversas.
- **Inmunofluorescencia indirecta:** Este método para este POE tiene por finalidad detectar los depósitos de C4d en los capilares peritubulares renales. La técnica consta de dos pasos bien definidos. En un primer paso los anticuerpos específicos sin marcaje reaccionan con el antígeno uniéndose a la superficie del portaobjetos y las inmunoglobulinas no unidas al antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un segundo paso el complejo antígeno-anticuerpo formado en el primer paso es revelado mediante globulina antihumana marcada con fluoresceína, resultando visible al microscopio de fluorescencia.
- **C4d:** Es una glicoproteína fragmento de C4 resultante de la activación del complemento por la vía clásica o de las lectinas. Este fragmento es muy estable y se



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA C4d EN BIOPSIA RENAL POR CONGELACIÓN	POE-019-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	88	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

une covalentemente a las superficies celulares, y puede ser detectado con los reactivos actualmente disponibles.

CONDICIONES GENERALES

- La biopsia renal debe recibirse en frascos estériles transparentes de 5 mL que contengan en promedio 3 mL de PBS o suero fisiológico.
- Tamaño de la biopsia renal: depende de la aguja de extracción y del paciente (adulto y pediátrico).
- El volumen del PBS o suero fisiológico debe ser 10 veces el volumen de la biopsia.
- La biopsia en frasco cerrado con tapón debe almacenarse refrigerado a temperaturas entre 4 a 8°C, hasta su procesamiento.
- Para obtener un mejor resultado de la inmunofluorescencia, se sugiere que la biopsia debe procesarse hasta 4 horas después de su extracción.
- Método a utilizar es la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

MATERIALES

- Láminas portaobjeto.
- Laminillas cubreobjetos.
- Cuchillas universales de perfil alto.
- Pipetas Pasteur.
- Micropipetas y tips estériles.
- Frascos Coplin.
- Lapicero hidrofóbico.

EQUIPOS

- Cabina de flujo laminar.
- Criostato.
- Microscopio de Inmunofluorescencia con cámara fotográfica.

REACTIVOS

- Acetona fría.
- PBS 1X.
- Antibody diluent With Background Reducing Components, Dako, Ref: S3022.
- Mouse Anti-Human C4d (1.0mg/mL), BioRad, Ref: 2222-8004
- Polyclonal Rabbit anti-Mouse Immunoglobulins/FITC (1.5mg/mL). Dako, Ref: F0261
- Glycerigel Mounting Medium, Dako, Ref: C0563.

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

- La biopsia renal es realizada por los nefrólogos y lo colocarán en el frasco estéril que contiene PBS 1X o suero fisiológico a 4°C y será trasladado al laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular con la solicitud del laboratorio donde se consigne los datos y resumen de la historia clínica del paciente.
- El procesamiento de la muestra debe de realizarse dentro de las 4 horas de obtenida la biopsia renal.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA C4d EN BIOPSIA RENAL POR CONGELACIÓN	POE-019-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	89	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev..02

PREPARACION Y RECONSTITUCION DE INSUMOS

No Aplica.

CALIBRACION DEL EQUIPO.

El método de proceso es manual.

CONTROL DE CALIDAD

Se verificará que los reactivos inmunológicos sean expuestos solo en condiciones de esterilidad para evitar la contaminación y se almacenará a 4°C en sus respectivas cajas.

LIMITACIONES

- La biopsia fijada en formol al 10% invalida el proceso de inmunofluorescencia indirecta.
- Los reactivos inmunológicos que no estén refrigerados (2 a 8°C) y estén en contacto con la luz invalida el resultado de inmunofluorescencia indirecta.
- Los reactivos con fecha de caducidad vencida invalida el resultado de inmunofluorescencia indirecta.

PROCEDIMIENTO

El proceso de la biopsia renal se inicia cuando ésta es trasladada al Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular, y se describe a continuación:

1. En el criótomo a una temperatura de -30°C se realizarán 3 cortes de la biopsia renal de 3 micras de espesor cada uno y se colocan en láminas portaobjetos.
2. Fijar en acetona fría a 4°C durante 10 minutos en un vaso Coplin.
3. Secar las láminas con los cortes al aire (ventilador) aproximadamente por 10 minutos.
4. Delimitar periféricamente cada sección mediante un círculo realizado con un lapicero hidrofóbico.
5. Lavar con Solución PBS frío pH 7.4 en vaso Coplin mediante inmersión 2 veces por un tiempo de cinco minutos cada vez.
6. Lavar en agua destilada estéril mediante inmersión 10 veces.
7. Drenar el exceso de líquido y secar alrededor del círculo con papel toalla.
8. Añadir 2 gotas de Solución de bloqueo de fondo DAKO S3022 y dejar reposar a temperatura ambiente por 5 minutos.
9. Aspirar la solución de bloqueo sin tocar la muestra.
10. Se agrega el primer anticuerpo Anti C4d (BioRad 2222-8004) dilución 1:100 (1.0 ug/mL) y se deja incubar en cámara húmeda y oscura a temperatura ambiente por 30 a 40 minutos.
11. Realizar dos lavados en PBS de 5 minutos cada uno y secar en torno al círculo, después lavar con agua destilada 10 veces por inmersión.
12. Secar la lámina por los bordes.
13. Se agrega el segundo anticuerpo (Polyclonal Rabbit anti-Mouse Immunoglobulins / FITC) 20 a 30 uL (Dako F0261) dilución 1:100 y concentración de 1.5 ug/uL y se deja incubar por 30 a 40 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda, cubriéndolo de la luz.



	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA C4d EN BIOPSIA RENAL POR CONGELACIÓN	POE-019-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG.	90	APROBADO	Zegarra Montes, L

LHBM-UTR rev.:02

14. Lavar dos veces en Solución PBS por 5 minutos y después lavar con agua destilada 10 veces por inmersión.
15. Secar los bordes.
16. Montar con laminilla cubreobjetos con 1 gota de medio hidrosoluble específico para inmunofluorescencia "Dako glycergel Mounting Medium CO563". (Calentar previamente el gel a 50°C para hacerlo líquido).
17. Se realiza la lectura en el microscopio de Inmunofluorescencia. Importante verificar los glomérulos (control interno positivo).

REPORTE DE RESULTADOS

Una vez concluido la lectura de la lámina se tomarán fotografías para documentar los resultados y se emitirá el informe escrito por el Médico Patólogo.

Se informará en porcentaje los capilares peritubulares renales que muestran inmunofluorescencia positiva en la misma intensidad que el control positivo (glomérulo) con respecto al total de la biopsia, de acuerdo a la siguiente tabla:

		% biopsy area (cortex and/or medulla)		Significance and interpretation according to technique	
		IF		IHC	
C4d0	Negative:	0%	Neg	Neg	
C4d1	Minimal	1<10%	Neg	Unknown	
C4d2	Focal	10-50%	Unknown	?Pos	
C4d3	Diffuse	>50%	Pos	Pos	

Figure 1: C4d scoring in peritubular capillaries (PTC) and influence of staining method.

American Journal of Transplantation 2008; 8: 753-760

Teniendo en cuenta que se realiza por Inmunofluorescencia (IF), informaremos como NEGATIVO la ausencia total de IF o su presencia en los capilares peritubulares hasta menos del 10% del total del área de la biopsia (C4d0 y C4d1 o negativo y mínimo). Se informará como POSITIVO si hay IF presente en los capilares peritubulares en más del 50% del total del área de la biopsia (C4d3 ó difuso). Resultados de IF presente entre el 10 – 50% (C4d2 o focal) se informarán como INCIERTO.

ENTRENAMIENTO

Al tratarse de pruebas de laboratorio especializado en biología molecular, el personal que trabaje en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular, deberá leer obligatoriamente este POE.

Asimismo, el manejo de este proceso requiere personal con experiencia en Inmunología, bajo la supervisión del personal encargado.

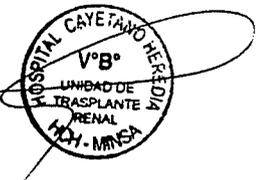


	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO	CODIGO	ELABORADO	Neyra Chagua, V
	INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA C4d EN BIOPSIA RENAL POR CONGELACIÓN	POE-019-02	REVISADO	Centeno Díaz, A
	PÁG. 91	APROBADO	Zegarra Montes, L	

LHBM-UTR rev.:02

REFERENCIA

1. Haas M, Sis B, Racusen LC, et al. Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection and Antibody-Associated Arterial Lesions. Am J Transplant. 2014 Feb; 14(2): 272-83.
2. Mosquera JM, Vásquez E. Diagnostic criteria of antibody-mediated rejection in kidney transplants. Nefrology, 2011 Apr, 31(4):362-91.
3. Sis B, Mengel M, Haas M, et al. 2010. Banff 09 Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups. Am J Transplant. 2010 Mar; 10(3): 464-71.
4. "Laboratorio de Anatomía Patológica". Raimundo García de Moral. Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Universitario San Cecilio. Granada-España 2009.





Versión 2018

FORMATO N° 01 TOMA DE MUESTRA PARA ESTUDIO HLA

Código Interno LHBM

PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DONANTE / RECEPTOR / POST-TRASPLANTADO

CROSSMATCH	TAMIZAJE /PRA	ANTIGENO AISLADO	TIPAJE MOL. HLA
------------	---------------	------------------	-----------------

Apellidos y Nombres:

Fecha de Nacimiento: Edad: Sexo:

Tipo de Paciente: Donante ; Receptor Grupo Sanguíneo:

Dirección:

Teléfono Casa: Teléfono Celular:

Hospital de Procedencia: HCH , N° H.C.: Otro:

Parentesco con el Receptor (Si es DONANTE):

Observaciones:.....

<p>Centro de Diálisis:</p> <p>Fecha inicio de Diálisis:</p> <p>Tipo de Diálisis: Peritoneal <input type="checkbox"/> Hemodiálisis <input type="checkbox"/></p> <p>Numero de Transfusiones sanguíneas:</p> <p>Fecha de última transfusión sanguínea:</p> <p>Número de Trasplantes: Fecha trasplante:</p> <p>Diagnóstico Clínico:</p> <p>Observaciones:</p>	RECEPTOR
---	-----------------

PERSONAL DE SALUD QUE TOMA LA MUESTRA

Nombre y Apellido:

Firma: Fecha y Hora:

Recibido por..... Fecha y Hora:

Observación Toma de muestra	Para RECEPTOR GENERAL	<ul style="list-style-type: none"> • 03 tubos con EDTA, tapa Lila (3 mL). • 01 tubo sin aditivo, tapa Roja (7 mL).
	Para DONANTE VIVO RELACIONADO	<ul style="list-style-type: none"> • 03 tubos con EDTA, tapa Lila (3 mL). • 01 tubo Citrato-Dextrosa (ACD), tapa amarilla (8 mL).
	Para DONANTE CADAVERICO	<ul style="list-style-type: none"> • 03 tubos con EDTA, tapa Lila (3 mL). • 2-3 Ganglios y 1 cuña de Bazo.





Versión 2018

FORMATO N° 02
RESULTADOS ESTUDIO HLA, VIVO RELACIONADO

Código Interno LHBM

RESULTADOS ESTUDIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD PARA TRASPLANTE
DONANTE VIVO RELACIONADO

(Carece de Valor si no está firmado y sellado por el personal autorizado)

DATOS GENERALES:
RECEPTOR : H. CLINICA:
DONANTE : H. CLINICA:
MEDICO TRATANTE: Fecha toma de muestra:

PRUEBA CRUZADA (CROSSMATCH)

LINFOCITOS T: COMPATIBLE INCOMPATIBLE
LINFOCITOS B: COMPATIBLE INCOMPATIBLE

OBSERVACION:

RESULTADOS RECEPTOR:

a) Tamizaje anticuerpos anti HLA, Panel de Anticuerpos Reactivos (PRA) o Antígeno Aislado (SA) LUMINEX®.
METODOLOGIA:
RESULTADO:
OBSERVACION:

b) HLA clase I y HLA clase II.
METODOLOGIA: Tipaje Molecular por la metodología.....
RESULTADOS: HLA- A* HLA- A*
HLA- B* HLA- B*
HLA- DRB1* HLA- DRB1*

OBSERVACION:

RESULTADOS DONANTE:

c) HLA clase I y HLA clase II.
METODOLOGIA: Tipaje Molecular por la metodología.....
RESULTADOS: HLA- A* HLA- A*
HLA- B* HLA- B*
HLA- DRB1* HLA- DRB1*

OBSERVACION:

RESULTADO FINAL Y COMENTARIO

.....
.....

Lima..... de..... del 2018

Biólogo Molecular
RESPONSABLE

Médico Patólogo
RESPONSABLE

Av. Honorio Delgado N° 262, Urb. Ingeniería, San Martín de Porres. Lima, Perú.
Teléfono (51-1) 482 - 0402 Anexo 330
Telefax: (51-1) 482-1410





PERÚ

Ministerio de Salud

Hospital Cayetano Heredia

LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y BIOLOGIA MOLECULAR (LHBM)

UNIDAD DE TRASPLANTE RENAL (UTR)

Versión 2018

FORMATO N° 03
RESULTADOS ESTUDIO HLA, LISTA DE ESPERA

Código Interno LHBM

RESULTADOS ESTUDIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD PARA RECEPTOR EN PREPARACION PARA INGRESO A LISTA DE ESPERA

(Carece de Valor si no está firmado y sellado por el personal autorizado)

DATOS GENERALES: RECEPTOR : H. CLINICA..... MEDICO TRATANTE:.....

RESULTADOS RECEPTOR:

a) Tamizaje anticuerpos anti HLA, Panel de Anticuerpos Reactivos (PRA).

METODOLOGIA: RESULTADO: OBSERVACION:

b) Tipaje Molecular HLA clase I y HLA clase II.

METODOLOGIA: Tipaje Molecular por

RESULTADOS: HLA- A* [] HLA- A* [] HLA- B* [] HLA- B* [] HLA- DRB1* [] HLA- DRB1* []

OBSERVACION:

RESULTADO FINAL Y COMENTARIO

.....

Biólogo Molecular RESPONSABLE

Médico Patólogo RESPONSABLE

Lima..... de..... del 2018

Av. Honorio Delgado N° 262, Urb. Ingeniería, San Martín de Porres. Lima, Perú. Telefono (51-1) 482 - 0402 Anexo 330 Telefax: (51-1) 482-1410





Versión 2018

FORMATO N° 04
RESULTADOS ESTUDIO HLA, DONANTE CADAVERICO

Código Interno LHBM

RESULTADOS ESTUDIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD PARA OPERATIVO
DONANTE CADAVERICO

(Carece de Valor si no está firmado y sellado por el personal autorizado)

DATOS GENERALES:
DONANTE H. CLINICA/PROCEDENCIA:.....
AUTORIZADO POR:.....FECHA OPERATIVO:.....

RESULTADOS DONANTE:

a) Tipificación molecular HLA clase I y HLA clase II.

METODOLOGIA: Tipaje molecular HLA baja / mediana resolución por PCR-SSP o PCR-SSO (LUMINEX®).

RESULTADOS:	HLA- A*	<input type="text"/>	HLA- A*	<input type="text"/>
	HLA- B*	<input type="text"/>	HLA- B*	<input type="text"/>
	HLA- DRB1*	<input type="text"/>	HLA- DRB1*	<input type="text"/>

OBSERVACION:

POSIBLES CANDIDATOS:

AUTORIZADO POR:
(Solo se realizara las pruebas cruzadas a aquellos candidatos con un match para HLA-A, B y DR, ABO compatible y PRA aceptable según norma MINSA-ONDT)

PRUEBA CRUZADA (CROSS MATCH):

Receptor 1.

LINFOCITOS T:	COMPATIBLE	<input type="text"/>	INCOMPATIBLE	<input type="text"/>
LINFOCITOS B:	COMPATIBLE	<input type="text"/>	INCOMPATIBLE	<input type="text"/>

OBSERVACION:

Receptor 2.

LINFOCITOS T:	COMPATIBLE	<input type="text"/>	INCOMPATIBLE	<input type="text"/>
LINFOCITOS B:	COMPATIBLE	<input type="text"/>	INCOMPATIBLE	<input type="text"/>

OBSERVACION:

RESULTADO FINAL.

.....
.....
.....

Lima..... de..... del 2018

Biólogo Molecular
RESPONSABLE

Médico Patólogo
RESPONSABLE

Av. Honorio Delgado N° 262, Urb. Ingeniería, San Martín de Porres. Lima, Perú.
Telefono (51-1) 482 – 0402 Anexo 330
Telefax: (51-1) 482-1410





PERÚ

Ministerio de Salud

Hospital Cayetano Heredia

LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y BIOLOGIA MOLECULAR (LHBM)

UNIDAD DE TRASPLANTE RENAL (UTR)

Versión 2018

FORMATO N° 05
RESULTADOS ESTUDIO HLA, PRA.

Código Interno LHBM

RESULTADOS PANEL DE ANTICUERPOS REACTIVOS (PRA)

PRE-TRASPLANTE

POST-TRASPLANTE

(Carece de Valor si no está firmado y sellado por el personal autorizado)

DATOS GENERALES:
 PACIENTE : H. CLINICA:.....
 AUTORIZADO POR:..... FECHA MUESTRA:.....

ANTECEDENTES DEL PACIENTE

SOBRE LA PRUEBA

TAMIZAJE búsqueda de anticuerpos anti-HLA, (LMX) *Immucor Lifecodes- LUMINEX®*.

1) Tamizaje de Anticuerpos Anti-HLA Clase I

RESULTADO:

Reactivo

No Reactivo

2) Tamizaje de Anticuerpos Anti-HLA Clase II

RESULTADO:

Reactivo

No Reactivo

ESPECIFICO Serología convencional (PANEL ESPECIFICO) *LID1 y LID2, Immucor Lifecodes- LUMINEX®*.

3) Panel de Anticuerpos Anti-HLA Clase I

RESULTADO:

PRA =

Anticuerpos encontrados:.....

4) Panel de Anticuerpos Anti-HLA Clase II

RESULTADO:

PRA =

Anticuerpos encontrados:.....

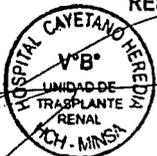
RESULTADO FINAL

Lima..... de..... del 2018

Biólogo Molecular
RESPONSABLE

Médico Patólogo
RESPONSABLE

Av. Honorio Delgado N° 262, Urb. Ingeniería, San Martín de Porres. Lima, Perú.
Teléfono (51-1) 482 - 0402 Anexo 330
Telefax: (51-1) 482-1410





PERÚ

Ministerio de Salud

Hospital Cayetano Heredia

LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y BIOLOGIA MOLECULAR (LHBM)

UNIDAD DE TRASPLANTE RENAL (UTR)

Versión 2018

FORMATO N° 06
RESULTADOS ESTUDIO HLA, SA.

Código Interno LHBM

RESULTADOS DE ANTIGENO AISLADO (SA)

PRE-TRASPLANTE

POST-TRASPLANTE

(Carece de Valor si no está firmado y sellado por el personal autorizado)

DATOS GENERALES:

PACIENTE : H. CLINICA:.....
AUTORIZADO POR:..... FECHA MUESTRA:.....

ANTECEDENTES DEL PACIENTE

SOBRE LA PRUEBA

TAMIZAJE búsqueda de anticuerpos anti-HLA, (LMX) Immucor Lifecodes- LUMINEX@.

1) Tamizaje de Anticuerpos Anti-HLA Clase I

RESULTADO:

Reactivo

No Reactivo

2) Tamizaje de Anticuerpos Anti-HLA Clase II

RESULTADO:

Reactivo

No Reactivo

ESTUDIO INMUNOLOGICO HLA (ANTIGENO AISLADO)

RESUMEN ENSAYO ANTIGENO AISLADO

Serología específica, búsqueda de antígenos HLA, "SINGLE ANTIGENS" (LSA1 y LSA2 IMMUCOR LIFECODES) LUMINEX@.

1) Antígeno aislado HLA clase I, reporte de datos

2) Antígeno aislado HLA clase II, reporte de datos

RESULTADO FINAL

Lima..... de..... del 2018

Biólogo Molecular RESPONSABLE

Médico Patólogo RESPONSABLE

Av. Honorio Delgado N° 262, Urb. Ingeniería, San Martín de Porres. Lima, Perú.
Telefono (51-1) 482 - 0402 Anexo 330
Telefax: (51-1) 482-1410





PERÚ

Ministerio de Salud

Hospital Cayetano Heredia

LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y BIOLOGIA MOLECULAR (LHBM)

UNIDAD DE TRASPLANTE RENAL (UTR)

Versión 2018

FORMATO N° 07
RESULTADOS IFI-C4d

Código Interno LHBM

RESULTADOS INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA C4d (IFI-C4d)

POST-TRASPLANTE

(Carece de Valor si no está firmado y sellado por el personal autorizado)

DATOS GENERALES:

PACIENTE : H. CLINICA:.....
AUTORIZADO POR:..... FECHA MUESTRA:.....

ANTECEDENTES DEL PACIENTE

SOBRE LA PRUEBA

Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta, para la determinación de C4d, como marcador de rechazo humoral.

1) Reactivo a C4d

RESULTADO:

Reactivo

No Reactivo

2) Score Reactivo C4d

- C4d0
- C4d1
- C4d2
- C4d3

Resultado

- Negativo (0%)
- Mínimo (1-10%)
- Focal (10-50%)
- Difuso (>50%)

Significancia

- Negativo
- Negativo
- Desconocido (umbral)
- Positivo

RESULTADO FINAL

.....
.....
.....
.....

Lima..... de..... del 2018

Biólogo Molecular
RESPONSABLE

Médico Patólogo
RESPONSABLE

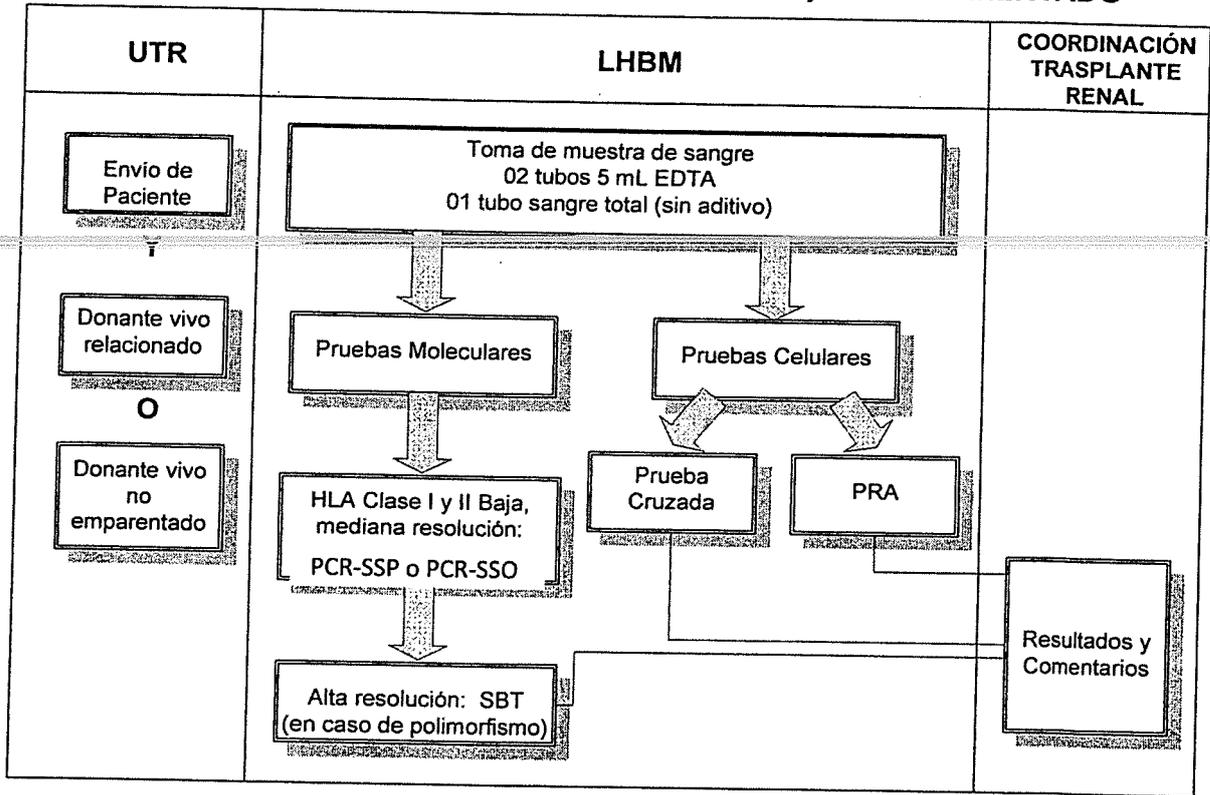
Av. Honorio Delgado N° 262, Urb. Ingeniería, San Martín de Porres. Lima, Perú.
Telefono (51-1) 482 - 0402 Anexo 330
Telefax: (51-1) 482-1410





Versión 2018

FLUJOGRAMA DEL ESTUDIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD MODALIDAD DONANTE VIVO RELACIONADO/NO EMPARENTADO



FLUJOGRAMA DEL ESTUDIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD MODALIDAD DONANTE CADAVERICO

