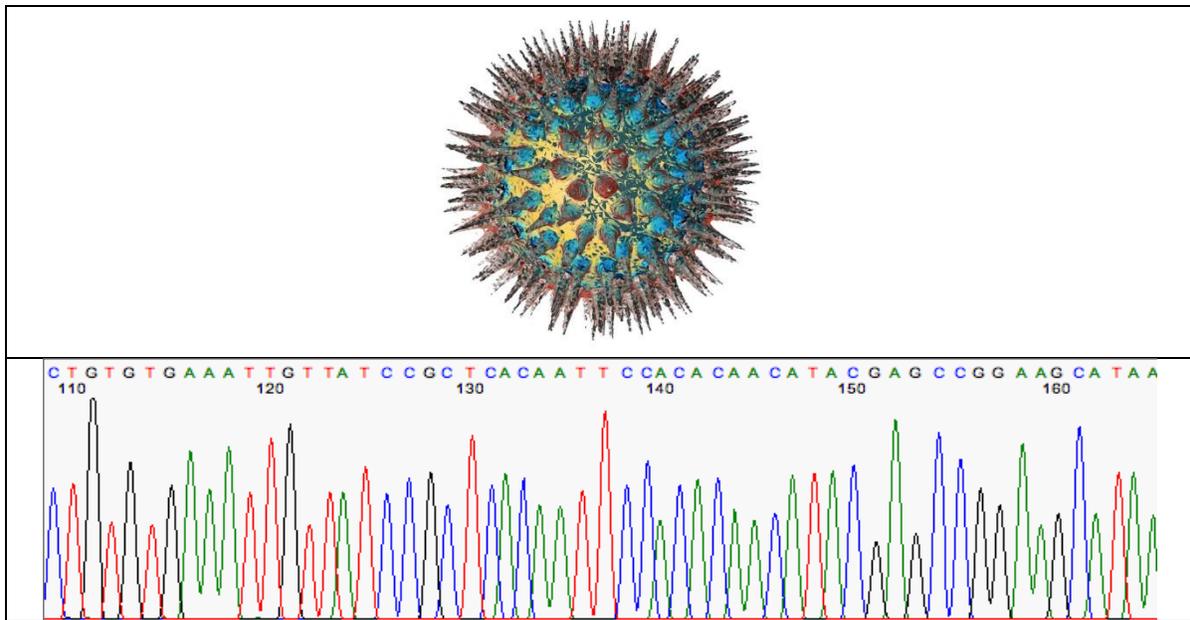


GENORRESISTENCIA CITOMEGALOVIRUS (CMV)



Elaborado por: Equipo Técnico de la Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento – Servicio de Patología Clínica	Revisado por: <ul style="list-style-type: none">• Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento• Unidad de Gestión de la Calidad	Aprobado por: Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director del Instituto a Nacional de Salud del Niño San Borja
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



GUÍA DE PROCEDIMIENTO GENORRESISTENCIA Citomegalovirus (CMV)

- I. Título 3
- II. Finalidad..... 3
- III. Objetivos..... 3
 - a. Objetivo General 3
 - b. Objetivos Específicos 3
- IV. Ámbito de aplicación 3
- V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT 3
- VI. Consideraciones Generales 3
 - a. Definiciones Operativas 3
 - 1. Definición del Procedimiento 3
 - 2. Aspectos Epidemiológicos importantes 4
 - 3. Consentimiento Informado 4
 - b. Conceptos Básicos..... 4
 - c. Requerimientos Básicos..... 4
- VII. Consideraciones Específicas 5
 - a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento: 5
 - PREPARACION DE LA MUESTRA (30 minutos)..... 5
 - EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL (120 minutos) 7
 - AMPLIFICACION POR PCR EN TIEMPO REAL (180 minutos)..... 8
 - ANALISIS DE DATOS Y VALIDACION DE PARAMETROS DE AMPLIFICACION (30 minutos)..... 10
 - PCR SECUENCIAMIENTO 11
 - b. Indicaciones..... 11
 - c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes: 11
 - d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes: 11
 - e. Contraindicaciones 11
- VIII. Recomendaciones 12
- IX. Autores, Fecha y Lugar 12
- X. Anexos 12
- XI. Bibliografía..... 12



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de Salud
del Niño - San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE GENORRESISTENCIA: CITOMEGALOVIRUS (CMV)

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE GENORRESISTENCIA: CITOMEGALOVIRUS (CMV)

I. Título

Genorresistencia Citomegalovirus (CMV)

II. Finalidad

Identificar en pacientes con infecciones activas de CMV, aquellos que presenten resistencia a antivirales producto de mutaciones y de esta manera plantear alternativas terapéuticas.

III. Objetivos

a. Objetivo General

Realizar la genotipificación de CMV en indicar las mutaciones relacionadas a resistencia a antivirales.

b. Objetivos Específicos

1. Identificar mutaciones en genes UL97 y UL54 de CMV por secuenciamiento directo Sangre.
2. Catalogar las mutaciones según su asociación a resistencia o sensibilidad a fármacos antivirales.
3. Sugerir alternativas terapéuticas según estudios de asociación a genorresistencia CMV.

IV. Ámbito de aplicación

Pacientes Institucionales y externos

V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT

Análisis de genotipo de agente infeccioso a partir de ácido nucleico (DNA o RNA); citomegalovirus (CPT: 87910)

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

La infección por citomegalovirus (CMV) es una complicación propia de pacientes post trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (HCT). Bajo esta condición, se emplean cuatro medicamentos antivirales para el tratamiento o como medida profiláctica: ganciclovir, valganciclovir, foscarnet y cidofovir. Por el uso prolongado y repetido de estos medicamentos, el CMV puede adquirir resistencia al tratamiento estándar, lo que conlleva al incremento de la morbilidad y mortalidad en



estos pacientes. La resistencia al CMV se diagnostica mediante detección de mutaciones específicas en los genes UL97, que confieren resistencia a ganciclovir y valganciclovir, y UL54, que confiere resistencia a múltiples fármacos. Los factores de riesgo en el receptor, incluyen el tipo de trasplante y el grado de inmunosupresión. Dependiendo de los resultados del genotipo, se pueden adoptar múltiples estrategias para tratar las infecciones resistentes al CMV.

2. Aspectos Epidemiológicos importantes

El INSN-SB hasta abril-2018, cuenta con los resultados del genoti

3. Consentimiento Informado

No requiere. Se atiende la Orden médica según indicación de médico tratante.

b. Conceptos Básicos

Este ensayo está basado en el secuenciamiento directo, utilizando PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), de regiones específicas de los genes UL54 y UL97 de CMV. El análisis bioinformático establecerá el tipo de mutación y su asociación con la resistencia o no a fármacos.

c. Requerimientos Básicos

Equipos Biomédicos.

- Termociclador en Tiempo Real Aria
- Cabina de Bioseguridad
- Centrifuga refrigerada
- Termociclador
- Cámara electroforética
- Transiluminador
- Termobloque
- Vortex
- Micropipetas 1-10 ul
- Micropipeta de 2 – 20 ul
- Micropipetas 20 – 200 ul
- Micropipeta de 100 – 1000 ul
- Congeladora de - 70 °C
- Congeladora de - 20 °C
- Refrigeradora de 2 a 8 °C

**Materiales Médicos no Fungibles.**

- Tips con filtro de 1 – 10 ul
- Tips con filtro de 2 – 20 ul
- Tips con filtro de 20 – 200 ul
- Tips con filtro de 100 – 1000 ul
- Crioviales de 2.0 ml
- Gradillas para tubos de 2.0 ml
- Gradilla de tubos de 12x75 mm
- Criobox
- Contenedor de desechos biológicos de 1L
- Contenedor de desechos biológicos de 4L
- Placas de PCR
- Tapas de microtubos de 0.2 ml para PCR en tiempo o Real.

Materiales Médicos Fungibles.

- Kit de Extracción de ADN viral
- Kit de PCR SybrGreen PCR Tiempo Real
- Set de primers específicos para gen UL54 y UL97
- BigDye terminator para secuenciamento
- Kit de purificación de productos PCR
- Papel absorbente.
- Guantes de nitrilo
- Gafas protectoras.
- Etanol Absoluto

VII. Consideraciones Específicas**a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:****PREPARACION DE LA MUESTRA (30 minutos)****Al inicio del trabajo:**

- Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
- Antes de iniciar cualquier procedimiento limpiar con alcohol Etilico al 70% o Hipoclorito de sodio al 10 %, las superficies de las mesas de trabajo.
- Utilizar contenedores de descarte para objetos punzo cortantes y biocontaminados.



Numeración y Centrifugación:

- Verificar la calidad de las muestras extraídas, por ejemplo:
- Presencia de coágulos
- Identificación en tubo de colección con EDTA y orden de laboratorio
- Numerar en orden correlativo cada una de las muestras extraídas consignando los siguientes datos:
 - Tipo de Examen solicitado
 - Fecha de la toma de muestra
- La numeración asignada debe estar indicada en la orden de laboratorio como en el tubo que contiene la muestra. Ejemplo
 - 1 RCMV/01-11-17,
 - 2 RCMV/01-11-17
- Reposar las muestras extraídas en posición vertical por 20 minutos a temperatura ambiente.

Almacenamiento:

- Rotular en orden correlativo los crioviales o tubos necesarios según el cantidad de muestras indicando los siguientes datos:
 - Nombre del Paciente
 - Numeración asignada según tipo de Examen solicitado/Fecha de toma de muestra.

Ejemplo:

Pablo Ruiz Fernández
RCMV/01-11-17

- Almacenar la sangre total en el correspondiente Criobox según el tipo de prueba en la refrigeradora 2 a 8°C hasta su procesamiento.

Al Final del trabajo:

- Limpiar la superficie de la mesa de trabajo utilizada.
- Dejar los materiales utilizados en su lugar respectivo.
- Eliminar los guantes y/o otros materiales descartables en los reservorios adecuados (bolsa roja).
- Lavarse las manos con jabón desinfectante disponible.



EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL (120 minutos)

Preparación de las muestras:

- Hacer la lista de trabajo, indicando nombres y fecha de toma de muestra de las muestra que se van a procesar.
- Extraer las muestras de sangre total del refrigerador 2 a 8°C según la lista de trabajo del día
- Dejar las muestras a temperatura ambiente.

Preparación de los Reactivos:

- Extraer (según el número de muestras clínicas y controles a procesar) las columnas de Extracción del refrigerador (2 - 8 °C) y dejar atemperar a temperatura ambiente.
- Trasvasar el contenido del frasco de lisis 1 (BL1) en el frasco de lisis 2 (BL2). Indicar la fecha de preparación de la solución de lisis 2 (BL2) rotulando el frasco.
- Agregar 28 ml de Etanol absoluto a la solución de lavado 2 (BW2) y mezclar por inversión. Dejar indicado en el frasco la fecha de preparación.
- Preparar la solución de lisis de trabajo del día según el número de determinaciones (muestras clínicas y Control NTC) a procesar. Utilizar las proporciones en la tabla. Mezclar bien utilizando el vortex

Proceso de Extracción:

- Rotular en orden ascendente el número de crioviales necesarios según la lista de trabajo del día.
- Mezclar por vortex vigorosamente las muestras y controles (Aproximadamente por 10 segundos).
- Dispensar 25 ul de Proteinasa K a cada criovial que se va a utilizar según la lista de trabajo del día.
- Agregar 200 ul de cada una de las muestras
- Agregar 200 ul de la solución de lisis del día preparada.
- Mezclar por vortex vigorosamente (Aproximadamente por 10 segundos).
- Dejar reposar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Mezclar por vortex vigorosamente (Aproximadamente por 10 segundos).
- Incubar a 70 °C por 15 minutos en un termobloque de calor seco.
- Sacar las muestras y mezclar vigorosamente en el vortex.
- Agregar 300ul de etanol absoluto a cada muestra
- Mezclar por vortex vigorosamente (Aproximadamente por 10 segundos).



GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE GENORRESISTENCIA: CITOMEGALOVIRUS (CMV)

- Trasvasar el contenido de cada criovial en las columnas de extracción identificadas (utilizar pipetas de transferencia de 3ml)
- Centrifugar a 11 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
- Agregar 500ul de solución de lavado 1 a cada columna.
- Centrifugar a 11 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
- Agregar a cada columna 600ul de buffer de lavado 2.
- Centrifugar a 11000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
- Centrifugar a 13 000 x g por 2 minuto a temperatura ambiente para secar las columnas.
- Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
- Dejar reposar las columnas con las tapas abiertas por 10 min. a temperatura ambiente.
- Agregar 35ul de la solución de elución a temperatura ambiente directamente a la membrana de sílice de las columnas.
- Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 11000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- La solución eluida contiene ADN viral, para el proceso de amplificación. Si no se usa el mismo día congelar a -20°C

Final de trabajo:

- Limpiar la superficie de la mesa de trabajo utilizada.
- Dejar los materiales utilizados en su lugar respectivo.
- Eliminar los guantes y/o otros materiales descartables en los reservorios adecuados (bolsa roja).
- Lavarse las manos con jabón desinfectante disponible.

AMPLIFICACION POR PCR EN TIEMPO REAL (180 minutos)**Al inicio del trabajo:**

- Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
- Encender la Cabina de Bioseguridad asignada para la preparación y cargado de las reacciones de PCR. Ver PC-BM-I-004:

INSTRUCTIVO DE MANEJO CABINA DE BIOSEGURIDAD CLASE II TIPO AB.

- Retirar los reactivos para la preparación de la mezcla de PCR del congelador de -20 °C y dejar atemperar.
- Cortar las filas necesarias de la placa de PCR con sus respectivas tapas.

Preparación de la mezcla de PCR:

- Dispensar 10 ul de la master Mix SybrGreen, 2ul de cada primer UL54, UL97, 6ul de agua molecular.
- Mezclar por inversión sin formar burbujas y colocar 2ul de ADN extraído.
- Tape cada pocillo con las tapas especiales para reacciones en PCR en tiempo Real. No tocar las tapas con los dedos.
- Coloque la placa cargada en el bloque térmico del Termociclador Aria en tiempo Real y cierre la tapa del equipo.

Programación del equipo PCR Tiempo Real:

- Ingresar al software y elegir Quantitative PCR en la ventana new Options Screen.

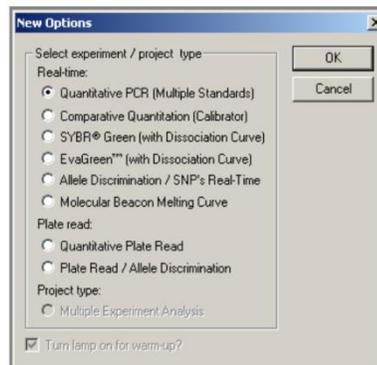


Figure 1. Starting the software.

- Ingresar los parámetros básicos de la muestra:
- Definir las posiciones de las muestras en la placa de PCR.
- En el menú de la derecha, selecciones e indique:
 - Well type: "Unknown"
 - Collect fluorescence data: SYBRGREEN
 - Reference dye: None
 - Replicate symbol: none

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE GENORRESISTENCIA: CITOMEGALOVIRUS (CMV)

- Haciendo doble click en cada pocillo, aparecerá el cuadro de diálogo de información del Pocillo. Introduzca según corresponda:

Nombre del paciente

- Configurar los parámetros de amplificación PCR con los siguientes datos:

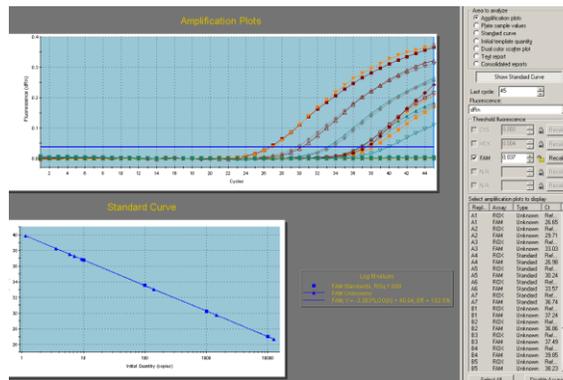
- Segmento 01
- Initial denaturation 95°C/10 min.
- Denaturation 95°C/5 sec.
- Annealing 60°C/40 sec. - reading of the fluorescence signal
- Extension 72°C/20 sec.

35 ciclos

- Guardar la corrida en la carpeta correspondiente y hacer click en Start para iniciar la corrida.

ANÁLISIS DE DATOS Y VALIDACION DE PARAMETROS DE AMPLIFICACION (30 minutos)

- Cuando el programa de amplificación haya culminado, hacer click en Analysis del menú de la izquierda.
- Active la pestaña de visualización del canal SYBRGREEN para verificar la amplificación de los Estándares.
- Hacer click en Amplificación plot y verifique los Ct de amplificación de cada muestra clínica.





PCR DE SECUENCIAMIENTO SANGER

Purificar los productos de PCR tiempo real

- Utilizar el BigDye terminator y el set de primers para gen UL54 y UL97.
- Programa de amplificación:
 - Denaturation 95°C/5 sec.
 - Annealing 60°C/40 sec. - reading of the fluorescence signal
35 ciclos
 - Extension 72°C/20 sec.
- Hacer electroforesis en gel y purificar amplicones por cada set de primers.
- Utilizar condiciones estándar de secuenciamiento en ABI 3500 para fragmentos de 600bp.
- Analizar secuencias en programas bioinformáticos y bases de datos de mutaciones.

b. Indicaciones.

1. Indicaciones Absolutas

Detección de mutaciones en CMV que confieren resistencia a fármacos en pacientes pos trasplantados del Servicio de TPH en pacientes con carga viral absoluta ≥ 700 copias ADN (CMV)/ml.

2. Indicaciones Relativas

Detección de mutaciones en CMV que confieren resistencia a fármacos en pacientes de los diferentes servicios del INSN-SB.

c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes:

Ninguno reportado

d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:

Ninguno reportado

e. Contraindicaciones

Ninguno reportado



VIII. Recomendaciones

- No cambie el ensayo. Es muy recomendable que un paciente monitorizado permanezca con el mismo tipo de ensayo durante el periodo completo de monitorización.
- No cambie la matriz de la muestra. Es muy recomendable usar la misma matriz de muestra durante el periodo completo de monitorización de cada paciente.
- No válido para cribado de sangre. El genotipaje para evaluación de resistencia CMV no se usa para cribado de sangre o de productos sanguíneos para identificar la presencia de CMV.
- Para uso profesional. Este procedimiento es sólo para uso profesional y por personal debidamente formado.

IX. Autores, Fecha y Lugar

Responsable:

- Blgo. Luis Martín Cruz Díaz
Enero 2019
San Borja, Lima, Perú

Fecha de elaboración y vigencia de la Guía de Procedimiento

- Fecha de Elaboración : Enero 2019
- Vigencia : 02 años

Autores:

- Blgo. Luis Martín Cruz Díaz e-mail : lcruz@insnsb.gob.pe
- Dra. Carla Mendez-Chacón Rodriguez e-mail : cmendez@insnsb.gob.pe
- Blga. Madeley Aliaga Zamudio e-mail : maliaga@insnsb.gob.pe
- Blgo. Luis Grados Molina e-mail : lgrados@insnsb.gob.pe

X. Anexos

No aplica

XI. Bibliografía

- Firas El Chaer, 1,2 Dimpy P. Shah, 1 and Roy F. Chemaly . How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients . BLOOD, 8 DECEMBER 2016 x VOLUME 128, NUMBER 23
- Sunwen Chou. Approach to Drug-Resistant Cytomegalovirus in Transplant Recipients. Curr Opin Infect Dis. 2015 August ; 28(4): 293-299.
- Sunwen Chou. Recombinant Phenotyping of Cytomegalovirus UL97 Kinase Sequence Variants for Ganciclovir Resistance. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, June 2010, p. 2371-2378
- Manual de instrucciones del kit affigene® DNA extraction.