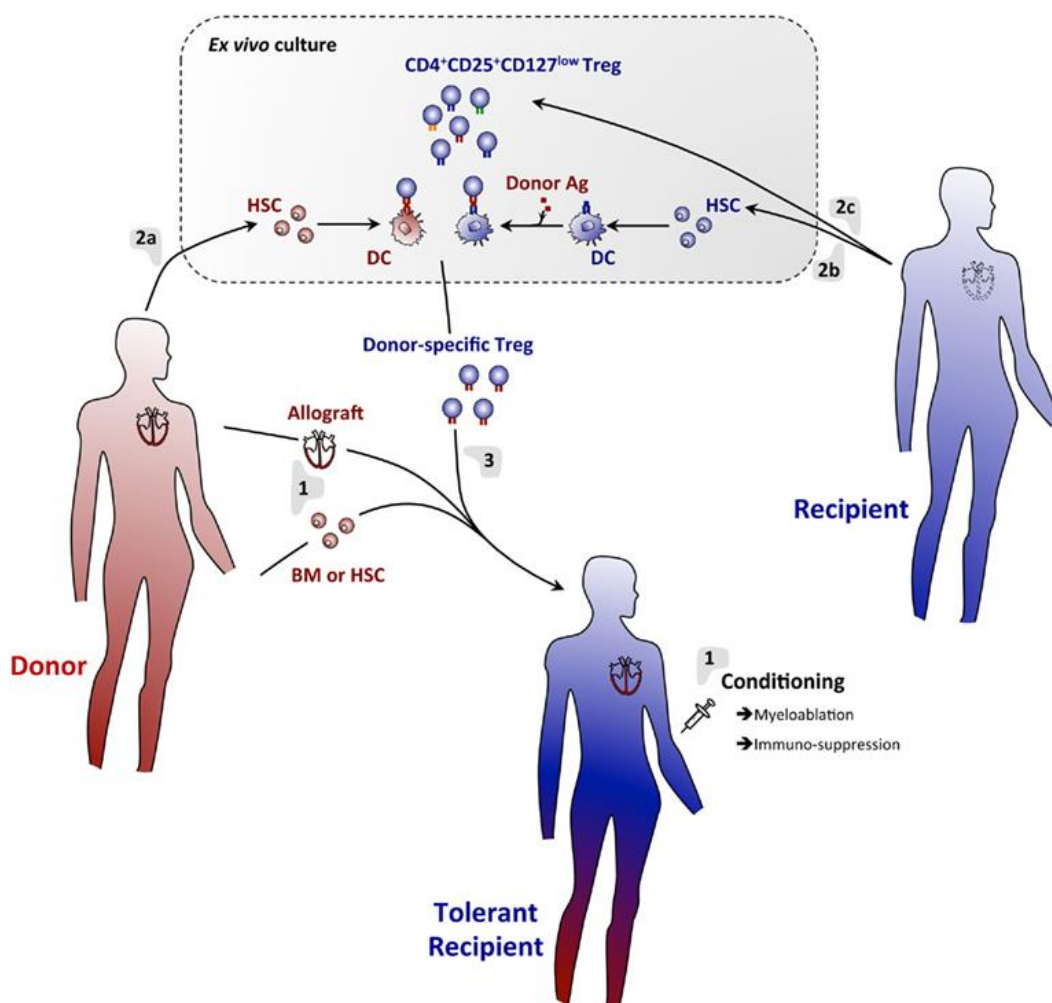


GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO PRE TRASPLANTE

QUIMERISMO PRE TRASPLANTE

SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR e HISTOCOMPATILIDAD



Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Equipo Técnico del Área de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Servicio de Patología Clínica	<ul style="list-style-type: none"> Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico Unidad de Gestión de la Calidad 	<p>Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio</p> <p>Director (e) del Instituto Nacional de Salud del - Niño San Borja</p>

Fecha: Marzo 2019	Código: GP-012/INSN-SB/USDXT/PC-V.01	Página 1 de 9
-------------------	--------------------------------------	---------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO PRE TRASPLANTE

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO PRE TRASPLANTE

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	3
	3. Consentimiento Informado	3
	b. Conceptos Básicos	3
	c. Requerimientos Básicos	4
VII.	Consideraciones Específicas	5
	a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento.....	5
	a.1. Preparación de la Muestra	5
	a.2. Extracción de ADN genómico (60 minutos).....	6
	a.3. Amplificación por PCR en tiempo final (120 minutos)	7
	a.4. Electroforesis capilar	8
	a.5. Análisis de resultados	8
	b. Indicaciones.....	8
	1. Indicaciones Absolutas	8
	2. Indicaciones Relativas	8
	c. Riesgos o complicaciones	8
	d. Contraindicaciones.....	8
VIII.	Limitaciones y Validez de los Resultados	8
IX.	Recomendaciones	9
X.	Autores, fecha y lugar.....	9
XI.	Anexos	9
XII.	Bibliografía.....	9

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO PRE TRASPLANTE

I. Título

Guía de procedimiento de Quimerismo Pre Trasplante

II. Finalidad

En el Quimerismo Pre-trasplante del paciente y su donante, se utiliza para conocer y establecer el patrón genético de las células sanguíneas de ambos, previo al trasplante de progenitores hematopoyéticos TPH.

III. Objetivos

a. Objetivo General

Establecer el perfil genético del donante y receptor

b. Objetivos específicos

Establecer el perfil genético del donante mediante el análisis de STR (short tandem repeats)

Establecer el perfil genético del receptor mediante el análisis de STR (short tandem repeats)

IV. Ámbito de aplicación

Pacientes del programa de trasplante de progenitores hematopoyéticos y sus respectivos donantes del INSNSB.

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

Quimerismo Molecular Cuantitativo

CPT : 81265

CÓDIGO POE : PC-BMOL

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

El Quimerismo Molecular Pre Trasplante consta de la identificación de los alelos pertenecientes a los 24 loci que conforman el perfil genético de un individuo. En la fase pre trasplante se identifican dos perfiles genéticos individuales (donante y receptor).

Estos perfiles serán de utilidad para el estudio del quimerismo molecular cuantitativo en la fase pos trasplante, que tiene por finalidad establecer el porcentaje de perfiles genéticos (donante – receptor) en una muestra de sangre ó médula ósea extraída del receptor.

2. Consentimiento Informado

No requiere

b. Conceptos Básicos

El quimerismo es importante en el trasplante hematopoyético, destacándose por la amplificación de zonas altamente polimórficas en el ADN por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa. La utilización de esta técnica ha permitido realizar estudios de la evolución de

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO PRE TRASPLANTE

la quimera, relacionar el grado de quimerismo establecido con el comportamiento del injerto y de la enfermedad de injerto contra hospederio en los diferentes regímenes de acondicionamiento. También ha posibilitado la detección precoz de la recaída en los pacientes trasplantados y la administración oportuna de inmunoterapia adicional. El polimorfismo de los VNTR o los STR es una característica hereditaria y por esto siempre se estudian varios VNTR o STR en el paciente y el donante (que en general son hermanos) con el objetivo de encontrar los que sean diferentes, y por lo tanto, útiles para el estudio del quimerismo. La introducción de la técnica de la PCR como método rápido para multiplicar estas zonas, ha proporcionado una poderosa herramienta para el estudio del quimerismo. Su principal ventaja es la gran sensibilidad, que permite detectar pequeñas poblaciones de células del donante o del receptor. Con esta técnica, es posible realizar un estudio cinético del comportamiento del injerto, e incluso encontrar evidencias de un injerto establecido antes que las evidencias morfológicas aparezcan.

En los estudios de quimerismo con la técnica de la PCR la sensibilidad aumenta cuando se estudian las líneas celulares separadas, lo que permite alcanzar mayor exactitud en la evaluación de los diferentes regímenes de acondicionamiento. Por ejemplo, un caso puede tener el 10 % de células T en los leucocitos de la sangre periférica y el 3 % de estas células en la médula ósea. La sensibilidad del método para la determinación del quimerismo es del 1.

c. Requerimientos Básicos

- Equipos Biomédicos
 - Analizador Genético de Capilares
 - Termociclador en Gradiente
 - Cabina de Bioseguridad
 - Ultracentrifuga refrigerada
 - 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
- Termoblock
- Vortex
- Micropipetas 1-10 ul
- Material médico no Fungible
 - 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
 - Tubos de 1.5 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
 - Tubos de PCR 0.2 ml
- Material médico Fungible
 - Reactivos
 - Kit de Extracción de ADN genómico
 - Kit de Amplificación de marcadores STR (24 marcadores)
 - Materiales
 - Guantes de nitrilo descartables
 - Lentes protectores de policarbonato

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO PRE TRASPLANTE

Soluciones

- Etanol Absoluto
- Formamida HiDi

➤ Recursos Humanos

- Técnico de laboratorio
- Biólogo
- Médico Patólogo Clínico

VII. Consideraciones Específicas**a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento**

Tiempo: 40 minutos

a.1. Preparación de la Muestra**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 Etílico 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:

Verificar la calidad de las muestras extraídas, por ejemplo:

- Presencia de coágulos
- Identificación en tubo de colección
- Orden de laboratorio
- Anticoagulante

Tipo de muestras:

- Sangre periférica, obtenida a partir del donante y receptor, el cual debe tener al menos 10 días de no haber recibido transfusiones.
- Folículo piloso, muestra obtenida a partir del receptor si los periodos de transfusión (<10 días), no permiten tomar sangre periférica

Numerar en orden correlativo cada una de las muestras extraídas consignando los siguientes datos:

- Examen solicitado
- Fecha de la toma de muestra
- Tipo de estudio: Quimerismo Pre trasplante

Fecha: Marzo 2019	Código: GP-012/INSN-SB/USDXT/PC-V.01	Página 5 de 9
-------------------	--------------------------------------	---------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO PRE TRASPLANTE

El código asignado debe estar indicado en la orden de laboratorio como en el tubo EDTA que contiene la muestra. Ejemplo

- Q16-001D: Donante caso 001
- Q16-001R: Receptor caso 001

Mezclar las muestras por inversión.

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.

a.2. Extracción de ADN genómico (60 minutos)**a.1. Preparación de reactivos**

- Añadir 30ml de etanol absoluto al frasco de Buffer de Lavado.

a.2. Proceso de Extracción

- Rotular en orden ascendente el número de crioviales necesarios según la lista de trabajo del día.
- Mezclar por inversión los tubos al vacío que contienen la muestra a evaluar (Aproximadamente por 10 segundos).
- Se procede a la extracción de dos muestras biológicas provenientes de donante y receptor.
- Cargar 200 µl de Sangre total fresca en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 o 2.0 µl.
- Agregar 200 µl de buffer de lisis
- Agregar 30 µl de Proteinasa K
- Adicional 20 µl de RNAasa A
- En el caso de fólculo piloso adicionar 20 µl de DTT 1M
- Mezclar por Vortex (Aproximadamente durante 5 segundos) e incubar a 56 °C por 20 minutos (calor seco), en el caso de fólculo piloso incubar 60 minutos.
- Transcurrido el tiempo, adicionar 200 µl de Etanol absoluto y mezclar por Vortex.

a.3. Unión a la Columna

- Cargar el lisado en una columna de extracción (aprox. 640 µl) utilizando una pipeta de transferencia estéril.
- Centrifugar la columna a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.

Fecha: Marzo 2019	Código: GP-012/INSN-SB/USDXT/PC-V.01	Página 6 de 9
-------------------	--------------------------------------	---------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO PRE TRASPLANTE

- Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un nuevo tubo de colección.

a.4. Lavados

- Agregar 500 ul de Wash Buffer 1
- Centrifugar la columna a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un nuevo tubo de colección
- Agregar 500 ul de Wash Buffer 2
- Centrifugar la columna a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente.
- Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml.

a.5. Elución

- Agregar 60 ul de Buffer de Elución.
- Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Proceder a la Cuantificación del ADN eluido.

a.6. Almacenamiento

- Almacenar a 4 °C si se va a utilizar el DNA extraído en corto tiempo o almacenar a -20°C por periodos más prolongados.

a.3. Amplificación por PCR en tiempo final (120 minutos)**Al inicio del trabajo:**

1. Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
2. Encender la Cabina de Bioseguridad asignada para la preparación y cargado de las reacciones de PCR.
3. Retirar los reactivos para la preparación de la mezcla de PCR del sistema de amplificación de fragmentos STR (24 marcadores) del congelador de -20 °C y dejar atemperar.
4. Colocar los tubos de PCR de 0.2 ml necesarios, según le número de casos a amplificar.

Preparación de la mezcla de PCR

1. Dispensar 15 ul de la mezcla de reacción STR en cada tubo de PCR.
2. Agregar 5 ul de la muestra y control de amplificación.
3. La cantidad de DNA a utilizar es de 1ng.

Fecha: Marzo 2019	Código: GP-012/INSN-SB/USDXT/PC-V.01	Página 7 de 9
-------------------	--------------------------------------	---------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO PRE TRASPLANTE

4. Initial denaturation 95°C/1 min
5. Establecer el número de ciclos (25, 26 ó 27)
6. Denaturación 94°C / 3 seg
7. Alineamiento-extensión 60° / 30 seg
8. Extensión final 60°C / 8 min
9. Hold 4°C al infinito

a.4. Electroforesis capilar

1. Preparar la mezcla de electroforesis capilar:
2. A cada muestra colocar 0.5 ul de Size standard LIZ 600, 9.5 ul de formamida y 1.0 ul de los amplicones
3. Denaturar a 95°C por 3 minutos y colocar en hielo directamente para promover la formación de ADN monocatenario.
4. Colocar en el analizador genético un número de muestras múltiplo de 8.
5. En caso se cuenten con un número menor de muestras completar los pocillos con 11 ul de Formamida HiDi

a.5. Análisis de resultados

Analizar los resultados en software GneMapper ID-X Software v1.4

b. Indicaciones**1. Indicaciones Absolutas**

Establecimiento de perfiles iniciales de donante y receptor, antes de realizado el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

2. Indicaciones Relativas

Establecimiento de perfiles iniciales de donante y receptor, antes de realizado el trasplante de progenitores hematopoyéticos, el perfil de receptor puede obtenerse a partir de una muestra de sangre periférica o bulbo piloso.

c. Riesgos o complicaciones

Ninguna

d. Contraindicaciones

Ninguna

VIII. Limitaciones y Validez de los Resultados

- 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.
- Realizar ensayos de sensibilidad. Diseñar el estudio de quimeras artificiales para valorar la sensibilidad del ensayo.
- Para uso profesional. Este procedimiento es sólo para uso profesional y por personal debidamente formado.

Fecha: Marzo 2019	Código: GP-012/INSN-SB/USDXT/PC-V.01	Página 8 de 9
-------------------	--------------------------------------	---------------



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO PRE TRASPLANTE

IX. Recomendaciones

No aplica

X. Autores, fecha y lugar

Luis Martín Cruz Díaz, Blgo - lcruz@insnsb.gob.pe
Madeley Aliaga Zamudio, Blgo - maliaga@insnsb.gob.pe
Carla Mendez Rodriguez Chacón, MC
Área de Biología Molecular
Febrero 2019 – Servicio de Patología Clínica
Vigencia: 1 año

XI. Anexos

No aplica

XII. Bibliografía

1. GlobalFiler™ Express PCR amplification Kit - User Guide
ThermoFisher Scientific – LifeTechnologies
2. DNA extraction. Manual Invitrogen DNA Mini Kit.

Fecha: Marzo 2019	Código: GP-012/INSN-SB/USDXT/PC-V.01	Página 9 de 9
-------------------	--------------------------------------	---------------