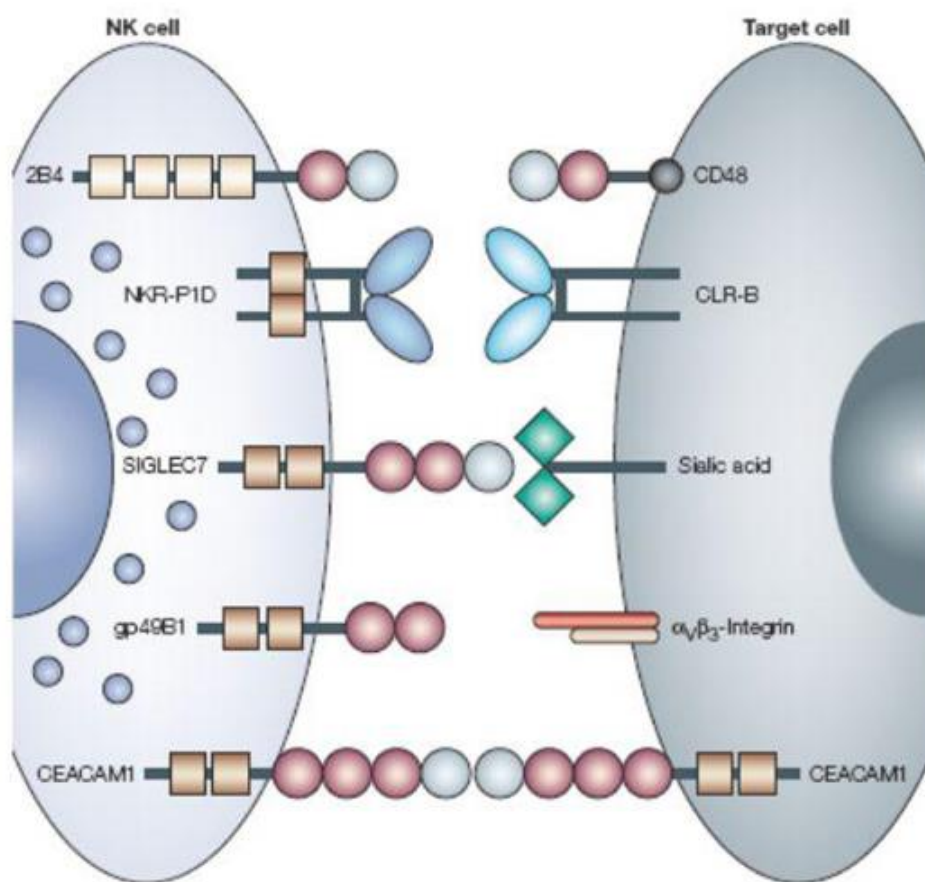


GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENOTIPO DE RECEPTORES KIR

Servicio de Patología Clínica

Laboratorio de Biología Molecular e Histocompatibilidad



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>

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

**GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO
DE GENOTIPO DE RECEPTORES KIR**

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.....	4
	1. Definición del Procedimiento	4
	2. Consentimiento Informado.....	4
	b. Conceptos Básicos.....	4
	c. Requerimientos Básicos	5
VII.	Consideraciones Específicas	6
	a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento	6
	b. Indicaciones.....	17
	1. Indicaciones Absolutas.....	17
	2. Indicaciones Relativas	17
	c. Riesgos o complicaciones frecuentes.....	17
	d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes.....	17
	e. Contraindicaciones.....	17
VIII.	Limitaciones y validez de los resultados	18
IX.	Recomendaciones.....	18
X.	Autores, fecha y lugar	18
XI.	Anexos.....	18
XII.	Bibliografía.....	23

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENOTIPO DE RECEPTOR KIR

**GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO
DE GENOTIPO DE RECEPTORES KIR****I. Título**

Guía de procedimiento de análisis de estudio de Genotipo de receptores KIR.

II. Finalidad

Contribuir con la mejora continua de los servicios de salud del INSN-SB, garantizando los procedimientos de laboratorio con estándares internacionales para determinar el genotipo de Receptores KIR mediante la tecnología Luminex xMAP.

III. Objetivos**a. Objetivo General**

Generar un proceso estandarizado para determinar el Genotipo de receptores KIR mediante la tecnología Luminex xMAP.

b. Objetivos específicos

- Establecer un flujo de trabajo desde la obtención de la muestra hasta la validación de los resultados.
- Contribuir a la selección del mejor donante en base al genotipo de receptores KIR.
- Predecir la actividad de las células NK luego del trasplante.
- Elaborar una base de datos de este grupo de genes de Receptores KIR en nuestra población.

IV. Ámbito de aplicación

La presente Guía de Procedimiento es de aplicación en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular – Servicio de Patología Clínica de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento del Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja. La población objetivo la constituyen los potenciales donantes de los pacientes pediátricos que estén en lista de espera para trasplante de Progenitores Hematopoyéticos haploidentico del INSN - San Borja.

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

Estudio de Genotipo de Receptores KIR

CPT : 81403

VI. Consideraciones Generales

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-017/INSN-SB/USDXT/PC-V 0.1	Página 3 de 23
------------------	---------------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

a. Definiciones Operativas**1. Definición del Procedimiento**

El sistema de genotipificación de Receptores KIR (Killer-cell immunoglobulin-like receptors) provee un panel de sondas de oligonucleótidos inmovilizadas sobre unas microesferas que permiten la identificación de alelos específicos en muestras de ADN amplificadas y mediante una reacción de hibridación ADN-ADN controlada son analizadas en un analizador de flujo LABScan3D.

2. Consentimiento Informado

Todo potencial donante debe recibir información sobre el procedimiento que se le va a realizar y autorizar la toma de muestra, almacenamiento y posterior utilización de las mismas en estudios complementarios y/o de investigación.

Ver Anexo 01: Declaración de Consentimiento Informado.

b. Conceptos Básicos

Linfocitos NK: Las células natural killers (NK) pueden diferenciar lo propio de lo extraño por la expresión de las moléculas de histocompatibilidad HLA clase I en células autólogas.

KIR: Son los receptores de las células Natural Killers (Killer-cell immunoglobulin-like receptors), expresados en la superficie de la célula NK, previene a las células NK de destruir células normales. Sin embargo, en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TPH) de donador haploidéntico, algunas células NK del donador pueden presentar la capacidad de destruir células del receptor. Esta función alorreactiva ha demostrado un efecto antileucemia, baja incidencia en el rechazo del injerto, reducción de la enfermedad injerto contra huésped (GVHD) y disminución de una recaída de leucemia. La familia de los genes KIR presenta variaciones en número de genes y polimorfismo alélico. Los genes KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 y KIR3DS1 se han reportado como benéficos en el trasplante. La genotipificación de KIR es de utilidad para la selección del donador y en predecir la actividad de la célula NK y de esta manera preservar el injerto en el tiempo.

GVHD: Enfermedad Injerto contra Huesped es una complicación potencialmente seria del alotrasplante de células madre, un tratamiento empleado para muchas enfermedades genéticas y tipos de cáncer de la sangre, tales como la leucemia y el linfoma.

Trasplante haploidéntico: El trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante haploidéntico es la alternativa en los casos en los que no hay donante HLA idéntico. Se da cuando el receptor y el donante comparten un haplotipo de genes HLA, generalmente son mejores candidatos los padres y hermanos no idénticos.

Alotrasplante: Cuando el trasplante de células, tejidos u órganos es entre individuos de la misma especie ya sean idénticos, haploidénticos o no emparentados.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

c. Requerimientos Básicos

- Equipos Biomédicos
 - Espectrofotómetro
 - Analizador de flujo LABScan™ 3D.
 - Centrífuga para microtubos de 1,5 – 2.0 ml
 - Centrifuga de micro placas de 96 pocillos
 - Termociclador
 - Refrigerador 2 – 8 °C
 - Congelador de – 30°C
 - Congelador de – 70°C
 - Cámara electroforética
 - Transiluminador UV.
 - Termobloque de calor seco
 - Vortex
 - Micropipeta automáticas de 1 – 10 ul
 - Micropipeta automáticas de 2 – 20 ul
 - Micropipeta automáticas de 10 – 100 ul
 - Micropipeta automática de 100– 1000 ul
 - Pipeta multicanal de 0.5 – 10 ul
 - Pipeta multicanal de 20 – 300 ul
 - Computadora
 - Impresora
- Material Médico No Fungible
 - Tips con filtro de 1 – 10 ul
 - Tips con filtro de 2 – 20 ul
 - Tips con filtro de 10 – 100 ul
 - Tips con filtro de 100– 1000 ul
 - Microtubos estériles de 1.5 – 2.0 ml
 - Microtubos estériles libres de DNA para elución de 1.5 ml
 - Gradillas para microtubos de 1.5 – 2.0 ml
 - Microtubo estéril de 0.5 ml
 - Tubos cónicos de 50 ml
 - Tubos cónicos estériles de 15 ml
 - Placas de PCR de 96 pocillos
 - Films sellador para microplaca de PCR de 96 pocillos
 - Microplaca de 96 pocillos,
 - Cubeta de carga para pipeta multicanal.
 - Plumón marcador indeleble, resistente al agua
 - Cronómetro
 - Contenedor de desechos biológicos de 1L
 - Contenedor de desechos biológicos de 4L
- Material Médico Fungible
 - Reactivos
 - Kit de genotipificación SSO KIR
 - Kit de extracción de ADN genómico
 - Materiales
 - Etanol Absoluto
 - Etanol al 70%.
 - Agua ultrapura grado molecular
 - Lejía al 10% (o equivalente)

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

- Agarosa
- Buffer TAE
- Colorante de carga
- SYBR® Safe
- Parafilm

- Recursos Humanos
- Técnico de laboratorio
 - Biólogo
 - Biólogo especialista
 - Médico Patólogo Clínico

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

Tiempo: 360 minutos

a.1. Toma de muestra (20 Minutos)**a.1.1. Al inicio del trabajo:**

1. Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
2. Toda muestra debe ser considerada potencialmente infecciosa y se deben tomar las precauciones que garanticen la seguridad del flebotomista y de los pacientes.
3. Antes de iniciar cualquier procedimiento limpiar con alcohol Etílico al 70% o Hipoclorito de sodio al 10 %, las superficies de las mesas de trabajo.
4. Utilizar contenedores de descarte para objetos punzo cortantes y biocontaminados.

a.1.2. Durante el proceso:

1. Identifique de manera correcta a los pacientes (Nombres completos, Historia clínica, examen solicitado)
2. Prepare los materiales que utilizará para la colección de la muestra.
3. Seleccione el sitio a puncionar, evite áreas con hematoma, fístulas, quemaduras, escoriaciones de la piel o cicatrices. Si se trata de un paciente hospitalizado evite tomar muestra de un brazo que se esté utilizando con venoclisis.
4. Coloque el torniquete 3 a 4 pulgadas por arriba del sitio seleccionado, para visualizarlas mejor. No mantener el torniquete por más de 3 minutos, para evitar la hemoconcentración.
5. Descontaminar el área con alcohol etílico utilizando algodón y con movimientos circulares del interior al exterior. Debe tener presente

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

que una vez realizada la descontaminación, no debe volver a tocar el área venosa.

6. Realizar la punción y extraer la muestra de Sangre periférica con sistema al vacío:
 - 2 tubos con EDTA (tapa Lila) de 4 ml.
7. Afloje el torniquete para que la sangre fluya mejor y remueva la aguja del brazo con movimiento suave al terminar de coleccionar, sin apretar el área de la punción con el algodón.
8. Presione el algodón sobre el sitio de la punción aplicando una presión adecuada y no excesiva para evitar la formación de hematoma.
9. Homogenizar las muestras por inversión.
10. Descarte la jeringuilla y aguja en un contenedor apropiado.
11. Rotular los tubos con las muestras extraídas indicando el nombre de los pacientes, fecha de toma de muestra y examen solicitado según la orden de laboratorio emitida.
12. Las muestras extraídas se mantienen en posición vertical a temperatura ambiente hasta su procesamiento analítico.

a.2. Extracción de ADN genómico (40 minutos)**Al inicio del trabajo:**

1. Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el ambiente de Extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN).
2. Antes de iniciar cualquier procedimiento limpiar con alcohol Etílico al 70% o Hipoclorito de sodio al 10 %, las superficies de las mesas de trabajo para mantener un ambiente estéril.
3. No mezclar los materiales, insumos, soluciones y/o instrumentos de las áreas de Pre-PCR, PCR y Post-PCR.
4. No mezclar reactivos de diferente lote ni fuera de la fecha de expiración.

Durante el Proceso:**Al iniciar un kit**

1. Preparar los reactivos Wash 1 y wash 2 de la siguiente manera:
 - Agregar 15 ml de Etanol Absoluto al frasco que contiene el reactivo Wash 1. Anotar fecha de preparación.
 - Agregar 17.5 ml de Etanol Absoluto al frasco que contiene el reactivo Wash 2. Anotar fecha de preparación.

Lisado celular

1. Cargar 200 ul de Sangre total fresca o congelada en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 o 2.0 ml.
2. Agregar 20 ul de Proteinasa K

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

3. Adicional 20 ul de RNAasa A
4. Mezclar por Vortex (Aproximadamente durante 5 segundos)
5. Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
6. Agregar 200 ul de Buffer Binding/lisis y mezclar bien hasta obtener una solución homogénea.
7. Incubar a 56 °C por 10 minutos (calor seco).
8. Adicionar 200 ul de Etanol absoluto.
9. Mezclar por Vortex (Aproximadamente durante 5 segundos)

Unión a la Columna

1. Cargar el lisado en una columna de extracción (aprox. 640 ul) utilizando una pipeta de transferencia estéril.
2. Centrifugar la columna a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un nuevo tubo de colección.

Lavados

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

Elución

1. Agregar 60 ul de Buffer de Elución.
2. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Proceder a la Cuantificación del ADN eluído.

Almacenamiento

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

Final del trabajo

1. Limpiar la superficie de la mesa de trabajo utilizada.
2. Dejar los materiales utilizados en su lugar respectivo.
3. Eliminar los guantes y/o otros materiales descartables biocontaminados en los reservorios adecuados (tacho con bolsa roja).

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

4. Lavarse las manos con jabón desinfectante disponible.

a.3. Cuantificación de ADN (20 minutos)**Al inicio del trabajo:**

1. Es obligatorio utilizar bata, guantes de nitrilo y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el ambiente de Extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN).
2. Antes de iniciar cualquier procedimiento limpiar con alcohol Etílico al 70% o Hipoclorito de sodio al 10 %, las superficies de las mesas de trabajo para mantener un ambiente estéril.

Durante el Proceso:

1. Encender el Espectrofotometro AQ-07
2. Lavar la micro cubeta del AQ-07 con 10 ul de agua molecular tres veces utilizando la micropipeta de 1 – 10 ul.
3. Ir al menú BLANK del espectrofotómetro AQ-07 y dispensar 10 ul de la solución de elución en la que se encuentra el ADN extraído en la micro cubeta de lectura.
4. Dispensar 10 ul del ADN extraído en la micro cubeta de lectura y proceder a leer mediante el MENU:
5. Measure dsDNA - GO
6. Anotar el valor de la concentración de la muestra en ug/ml
7. Medir la pureza de la muestra mediante el MENU:
8. Measure Purity - GO
9. Anotar el coeficiente de Pureza
10. Lavar la micro cubeta con 10 ul de agua molecular tres veces utilizando la micropipeta de 1 – 10 ul.
11. Repetir los pasos 4, 5, 6 y 7 para leer otras muestras
12. Para lavar la microcubeta del AQ-07 utilizar 10 ul de Etanol al 70 % y luego lavar con agua molecular.

a.4. Amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (120 minutos)**Al inicio del trabajo:**

1. Es obligatorio utilizar bata, guantes de nitrilo y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el ambiente de Extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN).
2. Antes de iniciar cualquier procedimiento limpiar con alcohol Etílico al 70% o Hipoclorito de sodio al 10 %, las superficies de las mesas de trabajo para mantener un ambiente estéril.

Durante el Proceso:

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

Para la realización de la PCR se requiere que el ADN extraído tenga una concentración de – 20 ng/ul, y una pureza de 1.65 - 1.80.

1. Realizar diluciones con agua molecular para ajustar la concentración a – 20ng/ul. Si las lecturas de concentración son inferiores puede realizarse la PCR con el doble de volumen de muestra extraída. De tener muestra suficiente se puede volver a extraer el ADN aplicando los protocolos de concentración.
2. En un microtubo de 0.5 estéril preparar la mezcla de reacción de PCR para cada GRUPO DE RECEPTORES KIR según las proporciones indicadas en la Tabla N°01:
 - GRUPO 1 (Exón 3+4)
 - GRUPO 2 (Exón 5)
 - GRUPO 3 (Exón 7-9)



Tabla N° 01: Mezcla de reacción de PCR

# de Reacciones	D-mix (ul)	Primer de amplificación (ul)	Taq Polimerasa (ul)
1	13.8	4	0.2
10	138.0	40	2.0
50	690.0	200	10.0
96	1491.0	432	21.6

3. Dispensar 2 uL del ADN ajustado a una concentración de 20 ng/ul a cada pozo de la placa de PCR según corresponda para cada grupo de receptores KIR. Protéjalos de la evaporación o contaminación tapándolos parcialmente.
4. Adicionar 18 ul de la mezcla de reacción de PCR preparada según corresponda.
5. Sellar bien la placa de PCR con el films correspondiente.
6. Colocar la placa en el Termociclador previamente programado con el Programa de amplificación KIR SSO PCR respectivo, el cual se detalla en la tabla N°02.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

Tabla N° 02: Programa de Amplificación KIR SSO PCR (OLI-2)

Paso	Temperatura y Tiempo de Incubación	# de ciclos
1	96 °C 03:00	1
2	96 °C 00:20	5
	60 °C 00:20	
	72 °C 00:20	
3	96 °C 00:10	30
	60 °C 00:15	
	72 °C 00:20	
4	72 °C 10:10	1
5	4 °C infinito	1

7. Realizar el corrido de electroforesis usando de 2-5 ul del producto de PCR para confirmar la amplificación (presencia de banda).
8. Si no se va a realizar la hibridación inmediatamente almacenar los productos de PCR de -20 °C a -80°C (Duración hasta 1 mes).

a.5. Electroforesis en gel (40 minutos)**Preparación del gel de agarosa:**

1. Disolver 1.25 gr de agarosa en 50 ml de Buffer TAE. Verificar que la solución se torne homogénea y de un color transparente.
2. Dispensar la agarosa en la cubeta de Electroforesis.
3. Colocar los “peines” correspondientes en la posición correcta para la formación de los pocillos.
4. Dejar enfriar hasta que la solución se solidifique y retirar los “peines”.
5. Agregar el buffer de corrida en cantidad suficiente hasta cubrir en su totalidad el gel (Aprox. 500 ml).

Cargado de los amplificados:

1. En una superficie de parafilm dispensar 2.5 de cada amplificado y mezclar con el buffer de carga o azul de bromofenol.
2. Dispensar cada mezcla en los pocillos del gel correspondientes.

Corrida electroforética:

1. Conectar los electrodos en las posiciones correspondientes (polo positivo o cátodo en la parte inferior y polo negativo o Ánodo en la parte superior).
2. Encender la fuente poder y programar la corrida a un voltaje constante de 210 V por 40 minutos.
3. Realizar la corrida electroforética por el voltaje y tiempo programado.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

Tinción del Gel:

1. Sumergir el gel en una cubeta que contenga el colorante de tinción de ADN (SYBR Safe) disuelto en buffer TAE.
2. Dejar colorear por aproximadamente 15-20 minutos
3. Retirar el gel con cuidado que no se quiebre y colocarlo en el transiluminador.

Lectura de bandas:

1. Encender el transiluminador y observar la presencia de las bandas correspondientes a los exones 3+4 (2 BANDAS) para el grupo I, exón 5 (1 BANDA) para el grupo 2 y los exones 7+8+9 para los genes del grupo III (3 BANDAS).
2. Tomar registro del gel para su archivo correspondiente.
3. Eliminar el gel y guante utilizados en el reservorio correspondiente.
4. Vaciar el buffer de corrida en un reservorio limpio con tapa hasta su próximo uso.
5. Secar la cámara electroforética utilizando un paño absorbente.

a.6. Hibridación con Sondas de Oligonucleótido Específico (SSO) (80 minutos)

Al inicio del trabajo:

1. Es obligatorio utilizar bata, guantes de nitrilo y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el ambiente de Pos
2. Antes de iniciar cualquier procedimiento limpiar con alcohol Etílico al 70% o Hipoclorito de sodio al 10 %, las superficies de las mesas de trabajo para mantener un ambiente estéril.

Preparación del Equipo y Reactivos

NOTA: La mezcla de perlas, el buffer de Hibridación y el SAPE son susceptible a luz – mantenerlos en oscuridad.

El buffer de SAPE es susceptible a temperatura – Almacenar a temperatura de 4°C. Las perlas son enviadas congeladas y se deben mantener así hasta su uso – una vez descongeladas manténganse a 4°C.

Regrese todos los reactivos a condiciones apropiadas cuándo no están en uso.

1. Programe el termociclador para una temperatura indefinida a 60°C. Durante la incubación, recuerde de cubrir la placa con sello de PCR, utilice un almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa.
2. Alícuotas de Buffer de Desnaturalización (DB), Buffer de Neutralización (NB), Buffer de Hibridación (HB) deben ser almacenados a temperatura ambiente. El resto debe de regresar a refrigeración 4°C.
3. Combine la cantidad apropiada Mezcla de Perlas (BM) con la cantidad especificada de Buffer de Hibridación (HB) para preparar la Mezcla de perlas y

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

buffer de Hibridación (HBM) – Esto se hace inmediatamente siguiendo la neutralización de la muestras.

4. Alícuotar el volumen apropiado de Buffer de SAPE (SB) y lleve a temperatura ambiente. Recuerde de guardar reactivos no usados a 4°C. Prepare la Solución SAPE al 1X según la diagrama abajo– No mezclar hasta la tercera centrifugación. La Reserva de SAPE (SS) está a 100X.

Tabla N°03: Reactivos necesarios para preparación del SAPE 1X

Cantidad de Pruebas	SAPE (100X) uL	Buffer de SAPE uL
1	0.5	49.5
5	2.5	247.5
10	5	495
20	10	990
50	25	2475
100	50	4950

Desnaturalización / Neutralización

1. Transfiere 5ul de cada muestra de DNA amplificado en un pocillo limpio de una placa de 96 pocillos - asegure que la ubicación y la identificación sean anotadas.
2. Adicionar 2.5ul de Buffer de Desnaturalización (DB), mezclar repetidamente con la micropipeta y luego por vortex. Note que el color del amplificado se vuelva más intenso.
3. Incube por 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Adicionar 5ul de Buffer de Neutralización (NB), mezcle repetidamente con la micropipeta y luego por vortex. – note el cambio de color a un amarillo pálido.
5. Coloque la placa de producto de neutralización en un baño de hielo – evite la contaminación del producto PCR con agua.

Hibridación

1. Combine volúmenes apropiados de Mezcla de Perlas (BM) y Buffer de Hibridación (HB) - mezclar por vortex. Consultar Tabla N°04: Reactivos necesarios para los procedimientos Post - PCR

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR
Tabla N°04: Reactivos necesarios para los procedimientos Post – PCR

Cant idad De Mue stras	Volúmenes de Alícuotas Requeridas a Temperatura Ambiente				Almacenar a 4°C
	Buffer de Desnatura lizacion (DB) uL	Buffer de Neutraliza tion (NB) uL	Buffer de Hibrida ción (HB) uL	Buffer de Lavado (WB) uL	Mezcla de Perlas (BM) uL
1	2.5	5	34	480	4
5	12.5	25	170	2400	20
10	25	50	340	4800	40
20	50	100	680	9600	80
50	125	250	1700	24000	200
100	250	500	3400	48000	400

- Adicionar 38ul de mezcla del buffer de hibridación y perlas a cada pocillo.
- Quite la placa del baño de hielo, cúbrala con el films para sellarla, y mezcle por vortex.
- Quite la placa del soporte y colóquela en el termociclador (60°C) pre calentado, utilice un almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa, incubar por 15 minutos.
- Coloque la placa en el soporte, quite el films y rápidamente añada 100ul de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, cubra nuevamente con el films y mezcle por vortex.
- Centrifugue la placa por 5 minutos entre 900-1000g. (1ER LAVADO).
- Elimine el sobrenadante haciendo un flicking.
- Coloque la placa en el soporte, quite el films y rápidamente añada 100ul de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, cubra nuevamente con el films y mezcle por vortex.
- Centrifugue la placa por 5 minutos entre 900-1000g. (2DO LAVADO).
- Elimine el sobrenadante haciendo un flicking.
- Coloque la placa en el soporte, quite el films y rápidamente añada 100ul de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, cubra nuevamente con el films y mezcle por vortex.
- Centrifugue la placa por 5 minutos entre 900-1000g. (3ER LAVADO).
- Elimine el sobrenadante haciendo un flicking.
- Preparar la Solución SAPE 1X durante la tercera centrifugación. Consultar
- Tabla N°03: Reactivos necesarios para preparación del SAPE 1X.

Identificación

- Coloque la placa en el soporte; añadir 50ul de la Solución SAPE 1X preparada a cada pocillo, cubra con un films y mezcle por vortex.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

2. Coloque la placa de PCR en el termociclador pre calentado a 60 °C, utilice una almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa, incubar por 5 minutos.
3. Saque la placa, y colóquela en el soporte, quite el films de la placa, y rápidamente añada 100ul de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa.
4. Centrifugar la placa por 5 minutos entre 900-1300g.
5. Elimine el sobrenadante haciendo un flicking y el exceso de líquido secar suavemente sobre un papel absorbente.
6. Adicionar 70ul del Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, mezcle con cuidado.
7. Traslade todo el contenido a la placa de lectura de 96 pocillos usando una pipeta multicanal de 8 o 12-puntas. El volumen final debe ser aproximadamente 80 ul.
8. Colocar la placa en el LABScan3D (previamente calibrado) para su lectura.
9. Si no se va a realizar la lectura inmediatamente mantenga la placa en oscuridad y a temperatura de 4°C hasta su lectura.

a.7. Calibración, lavados y programación del analizador de flujo utilizando el Xponent 4.2 software (20 minutos)**Calibración y Verificación**

El proceso de calibración debe realizarse periódicamente, según lo establecido por el laboratorio o cada vez que el equipo lo requiera.

1. Atemperar los viales del kit de Calibración LABScan3D (C1, eC, C2 y C3) y los viales del kit de verificación de Performancia LABScan3D (V1, Ev, V2, F1 y F2) durante 10 – 15 minutos.
2. Vortear cada uno de los viales y cargar de 4- 5 gotas de cada uno en los pocillos correspondientes en la placa a utilizar.
3. En el menú de Maintenance desde el programa Xponent 4.2: En la opción Cmds & routines seleccionar la opción Calibration Verification: Verificar que figuren los pocillos asignados para C1, eC, C2, C3, V1, Ev, V2, F1 y F2. Hacer Click en EJECT/RETRACT para colocar la placa cargada y nuevamente para cerrarla.
4. Iniciar el proceso de Calibración haciendo Click en RUN.

Lavados

Los lavados del equipo se deben realizar antes de iniciar cada proceso y al finalizar los mismos.

Al iniciar

1. Hacer CLICK en DAILY INSTRUMENT STARTUP:
2. Colocar las soluciones de lavado en los pocillos correspondientes:
3. Alcohol al 70% y solución de lavado (agua destilada).

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

4. Corroborar que el protocolo de mantenimiento diario cumpla con los siguientes pasos:
 - Warmup
 - Prime
 - Lavado con Alcohol Flush (70%)
 - Wash x2 (solución de lavado)
5. Hacer click en EJECT para guardar la plataforma e iniciar el proceso con RUN.

Adquisición de datos

1. Desde el programa xPONENT 4.2: En la página de inicio ingrese a la opción Batches, hacer click en Create a New Batch from an existing Protocol y en Batch Name colocar el nombre de la sesión según el siguiente modelo:
 - KIR GRUPO I/# LOTE/FECHA
 - KIR GRUPO II/#LOTE/FECHA
 - KIR GRUPO III/#LOTE/FECHA
2. Seleccione el Protocolo correspondiente al número de lote de reactivo utilizado, ya sea de RSSOKIR_LOTE XX_GRP1, RSSOKIR_LOTE XX_GRP2 o RSSOKIR_LOTE XX_GRP3. respectivamente.
3. En la placa de 96 pocillos seleccione las posiciones en las que se encuentran las muestras, asigne a cada una la condición de Unknown (U).
4. Luego de crear y guardar los batches correspondientes a las pruebas de GENOTIPO KIR GRUPOS I, II y III, haga click en la opción Create a New Multi-Batch, asigne un nombre en Multi-Batch Name y asigne las posiciones en la placa.
5. Coloque la placa en la plataforma XY e inicie la corrida haciendo click en RUN.

Lavados de finalización del equipo

1. Hacer CLICK en DAILY INSTRUMENT SHUTDOWN: Colocar la solución de limpieza (hipoclorito al 10%) en la posición correspondiente y verificar que el protocolo de finalización cumpla con los siguientes pasos:
 - Sanitize
 - Wash x2
 - Soak
2. Hacer click en EJECT para guardar la plataforma e iniciar el proceso con RUN.

a.8. Análisis de datos con HLA Fusion Research 6.0 SOFTWARE (20 minutos)

1. Abrir el programa HLA Fusion Research 6.0 y dar CLICK en SSO del menú principal de HLA Fusion Home.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

2. Seleccione los archivos de la lista de archivos CSV a importar o haga clic en el icono de carpeta (c:/OLI FUSION/data/sesión/SSO) arriba de la lista para explorar en busca de archivos CSV existentes.
3. Se deben importar las tres sesiones (GRUPO1, GRUPO2 y GRUPO 3) al mismo tiempo.
4. Haga clic en la lista de catálogos de análisis de Fusion Research 6.0 disponibles y seleccione el que corresponda al lote de reactivo de KIR SSO utilizados.
5. Importar las sesiones haciendo click en IMPORT.
6. En el árbol Navigator, haga clic en un nombre de sesión. Aparece el resumen de la sesión.
7. Haga doble clic en una muestra de la tabla de resumen para ir directamente a la pantalla de análisis para dicha muestra.
8. Evaluar los valores de MFI de los controles positivos para el exón 4 (bead ID:046), exón 7 (bead ID:056), exón 3 (bead ID:057), exón 5 (bead ID:082), los cuáles deben ser mayores a 1000 MFI.
9. Evaluar los controles negativos (Bead ID: 835, 935 y 035).
10. Realizar el análisis individualmente por cada muestra respecto del Cut off utilizado.
11. Los alelos en amarillos son considerados Match POSITIVOS, los rojos son Mismatch y los no coloreados son NEGATIVOS.
12. Elaborar Reporte de Laboratorio según formato. *Ver anexo 02: Reporte de resultados*

b. Indicaciones**1. Indicaciones Absolutas**

Determinar el genotipo de Receptores KIR en potenciales donantes de pacientes candidatos a trasplante de progenitores hematopoyéticos haploidéntico.

2. Indicaciones Relativas

Evaluar el efecto del genotipo de Receptores KIR de los posibles donantes de pacientes candidatos a trasplante de progenitores hematopoyéticos haploidénticos en el INSN San Borja.

c. Riesgos o complicaciones frecuentes

Ninguno

d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes

Ninguno

e. Contraindicaciones

Ninguno

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

VIII. Limitaciones y validez de los resultados

- Es muy importante un buen ajuste del luminómetro para que las lecturas sean reproducibles.
- Este procedimiento está indicado como referencia para fines de investigación en el trasplante de Progenitores Hematopoyéticos haploidéntico.
- Este procedimiento es sólo para uso profesional y por personal debidamente formado y capacitado.

IX. Recomendaciones

No aplica

X. Autores, fecha y lugar

Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja

Laboratorio de Biología Molecular e Histocompatibilidad-Servicio de Patología Clínica.

Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Fecha de Elaboración: Abril 2019

Vigencia: 02 años

Autores:

- | | |
|---|-------------------------|
| 1. Blga. Madeley Karin Aliaga Zamudio, Msc(c) | maliaga@insnsb.gob.pe |
| 2. Dra. Carla Elizabeth Mendez Chacón Rodríguez | cmendez@insnsb.gob.pe |
| 3. Blgo. Luis Eduardo Grados Molina | lgrados@insnsb.gob.pe |
| 4. Blgo. Luis Martín Cruz Díaz, Msc(c) | lcruz@insnsb.gob.pe |
| 5. Dra. Andrea de María Zavaleta Gonzales | azavaleta@insnsb.gob.pe |

XI. Anexos

Anexo 01: Declaración de consentimiento Informado

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRAS
BIOLOGICAS PARA ESTUDIOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y
BIOLOGIA MOLECULAR**

(DS.N°027-2015-SA. Reglamento de la Ley N°29414. Ley que establece los Derechos de las Personas Usuarias de los Servicios de Salud. Ley General de Salud N° 26842 .RD N°...../20...../INSN-SB)

1. SERVICIO/SUBUNIDAD

Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular/Servicio de Patología Clínica/Subunidad de Soporte al Diagnóstico.

2. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO

Toma de muestras biológicas para estudios de Histocompatibilidad y Biología Molecular.

3. DIAGNÓSTICO

Pacientes con enfermedades Hematológicas y Oncohematológicas candidatos a Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos y sus potenciales donantes.

4. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**5.****Toma de muestra sanguínea:**

- Una vez seleccionado el sitio de la punción se colocara un torniquete 3 a 4 pulgadas por arriba del sitio seleccionado.
- Se descontaminará el área con alcohol etílico haciendo movimientos circulares y se procederá a realizar la punción con una aguja estéril en ángulo de 45° colocando luego los tubos de extracción respectivos.
- Se aflojara el torniquete para un mejor flujo y se procederá luego a retirar la aguja suavemente.
- Con un algodón limpio se hará presión sobre el área de la punción con fuerza moderada para evitar hematomas.
- Al finalizar se colocara sobre el algodón una cinta adhesiva hipoalergénica en la zona de la punción.

Toma de muestra de hisopado bucal:

- Se utilizaran tres hisopos estériles para la obtención de la muestra.
- Se colocara el hisopo en la parte interna de la mejilla girándolo sobre la mucosa bucal en dirección hacia arriba y abajo unas 5-10 veces.
- Cada hisopo se introducirá en su respectivo tubo debidamente identificado.

Toma de muestra de Bulbo piloso:

- Ubique la pinza en la base de los cabellos que va a extraer, aplicando una presión moderada proceda a jalar hasta que el bulbo piloso este fuera.
- Corte el exceso de cabello y quédese sólo con los bulbos pilosos.
- Colóquelos en un microtubo de 2 ml estéril debidamente identificado.
- Extraiga un total de 20 cabellos, en el caso de pacientes en quimioterapia extraiga un mínimo de 40 cabellos.

6. OBJETIVOS DEL PROCEDIMIENTO

- Obtener una muestra biológica (sangre periférica u otro tejido si fuera el caso) del paciente y sus potenciales donantes, a partir de la cual se obtenga ADN (Ácido Desoxirribonucleico) necesario para la realización de los estudios pre trasplante de Histocompatibilidad y biología molecular.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

- Almacenar el ADN del paciente y potenciales donantes para su uso posterior en estudios de monitoreo pos trasplante, así como para su utilización en otros estudios complementarios y/o de investigación.

7. BENEFICIOS ESPERADOS

- La toma de muestra de otros tejidos como bulbo piloso o hisopado bucal como fuente de ADN es necesaria para reducir los tiempos de espera entre transfusiones y/o esquemas de quimioterapias.
- El almacenamiento de las muestras de ADN reducirá el número de toma de muestras posteriores al trasplante sobre todo para los estudios de monitoreo.
- El mantenimiento de la DNAteca permitirá realizar potenciales estudios complementarios y/o de investigación en los pacientes con enfermedades hematológicas y oncohematológicas.

8. RIESGOS Y/O COMPLICACIONES FRECUENTES

- La toma de muestra sanguínea causa dolor leve en la zona de la punción.
- La toma de muestra de otros tejidos como bulbo piloso e hisopado bucal no presentan riesgos ni complicaciones.

9. RIESGOS Y/O COMPLICACIONES POCO FRECUENTES

- Sangrado excesivo y hematoma.
- Desmayo o sensación de mareo.
- Infección.

10. CONSECUENCIAS PREVESIBLES DE SU NO REALIZACIÓN

- No sería posible realizar los estudios de histocompatibilidad pre-trasplante en la pareja Receptor-Donante
- No se contaría con el ADN necesario para realizar los estudios de monitoreo pos trasplante, así como estudios complementarios y/o de investigación.

11. TRATAMIENTO ALTERNATIVO

No aplica.

12. RIESGO EN FUNCIÓN DE LAS PARTICULARIDADES DEL PACIENTE

- Alteración de la coagulación, trombocitopenia.

13. PRONÓSTICO

No aplica.

14. RECOMENDACIONES

- Evitar hacer la punción en zonas enrojecidas con presencia de hematomas, quemadura o piel alterada.
- Procurar mover la aguja lo menos posible.
- Efectuar la inserción y manipulación con las máximas medidas de asepsia.
- Presionar durante 5 minutos la zona de punción, posterior al procedimiento.
- En el caso de la toma de muestra de hisopado bucal tener cuidado de no provocar microhemorragias en el epitelio bucal, aplicar presión moderada.
- En el caso de bulbo piloso, liberar el bulbo de la mayor cantidad de cabello.
- Si la mucosa presenta ulceraciones o algún otro tipo de lesión se recomienda esperar a que desaparezcan.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo _____, identificado (a) con DNI (),
C.E. (), Pasaporte () N° _____, en calidad de Madre (), Padre (), Apoderado/Tutor
Legal () del (la) paciente _____,
con _____ de edad, identificado con DNI N° _____, Historia Clínica N° _____
el _____
Diagnóstico _____
_____.

Declaro :

Que el Médico _____ con CMP N° _____, y RNE
N° _____, me ha explicado que es conveniente/necesario, debido al diagnóstico de mi
familiar, la realización de LA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA ESTUDIOS DE
HISTOCOMPATIBILIDAD Y BIOLOGÍA MOLECULAR sobre los cuales he sido informado(a). Así
mismo he comprendido los beneficios, probables riesgos o complicaciones del mismo.

Por lo tanto con la información completa, oportuna y sin presión; yo, voluntaria y libremente:

**Doy mi Consentimiento para la toma de muestras biológicas para estudios de
histocompatibilidad y biología molecular, su almacenamiento y posterior utilización en
estudios complementarios y/o de investigación.**

Firma del Representante Legal

Nombre _____

DNI N° _____



Huella
Digital

San Borja, de del 20

Firma del Médico Responsable

CMP N° _____

RNE N° _____

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Yo _____, identificado (a) con DNI (),
C.E. (), Pasaporte () N° _____, en calidad de Madre (), Padre (), Apoderado/Tutor
Legal () del (la) paciente _____, con
_____ de edad, identificado con DNI N° _____, Historia Clínica N° _____,
de forma libre y consciente he decidido **Revocar el Consentimiento**
firmado en fecha _____ para la realización de LA TOMA DE MUESTRAS
BIOLÓGICAS PARA ESTUDIOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y BIOLOGÍA MOLECULAR y asumo
las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida de mi representado.

Firma del Representante Legal

Nombre _____

DNI N° _____



Huella
Digital

San Borja, de del 20

Firma del Médico Responsable

CMP N° _____

RNE N° _____

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

Anexo 02: Reporte de Resultados

UNIDAD DE APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO
SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA – LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

REPORTE DE RESULTADO

GENOTIPO DE RECEPTORES KIR

(Killer cell immunoglobulin like receptors)

Nombre	Condición	Edad	Servicio Solicitante	Medico solicitante

Datos de Tipificación Molecular HLA

		A*	B*	C*	DRB1*	DQA1*	DQB1*
	Receptor						
	D-Madre						

Datos del estudio

Metodología: PCR - SSO
Sistema: KIR SSO Genotyping Test
Tipo de muestra: Sangre Total
Toma de muestra: 05-03.2019
Analista Responsable:
Médico Responsable:

RESULTADO

	CEN genes					TEL genes				CEN or TEL genes			Framework genes			
	2DS 2	2DL 2	2DL 3	2DP 1	2DL 1	3DL 1	2DS 4	3DS 1	2DS 1	2DL 5	2DS 3	2DS 5	3DL 3	3DP 1	2DL 4	3DL 2
KIR*	-															

*El presente estudio no es una prueba diagnóstica.

Comentario:

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE GENPOTIPO DE RECEPTOR KIR

XII. Bibliografía

1. S Cooley, DJ Weisdorf, LA Guethlein, JP Klein, T Wang, CT Le, SGE Marsh, D Geraghty, S Spellman, MD Haagenson, M Ladner, E Trachtenberg, P Parham and JS Miller. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2010. 116:2411-9.
2. Antonella Mancusi, Loredana Ruggeri, Elena Urbani, 1 Antonio Pierini, Maria Speranza Massei, Alessandra Carotti, Adelmo Terenzi, Franca Falzetti, Antonella Tosti, Fabiana Topini, Silvia Bozza, Luigina Romani, Rita Tognellini, Martin Stern, Franco Aversa, Massimo F. Martelli, and Andrea Velardi. Haploidentical hematopoietic transplantation from KIR ligand mismatched donors with activating KIRs reduces nonrelapse mortality. *BLOOD* 2015 (125); 20: 3173-3182.
3. Hilton HG, Parham P. Missing or altered self: human NK cell receptors that recognize HLA-C. *Immunogenetics*. 2017 Aug;69(8-9):567-579.
4. Colucci F, Traherne J. Killer-cell immunoglobulin-like receptors on the cusp of modern immunogenetics. *Immunology*. 2017 Dec;152(4):556-561.
5. KIR SSO Genotyping Test. Product insert. One Lambda, INC
6. https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html
7. <http://www.allelefrequencys.net/kir6001a.asp>