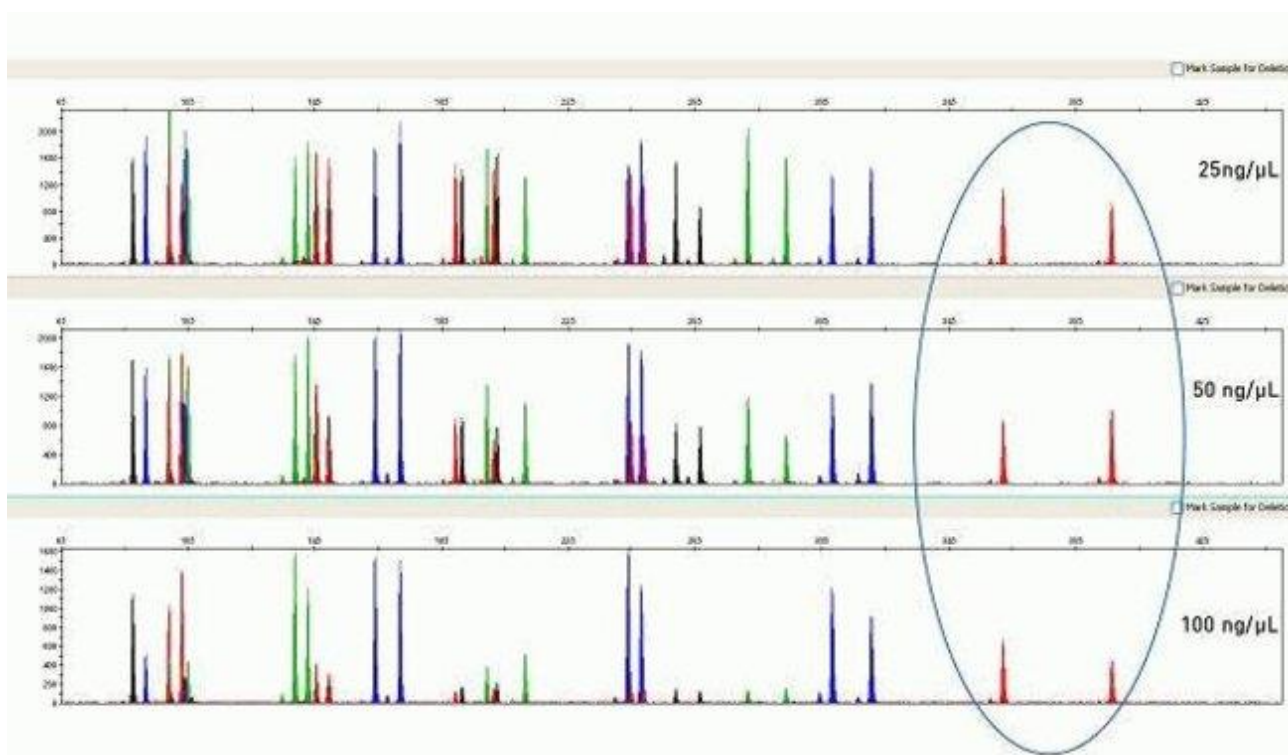


QUIMERISMO POST TRASPLANTE CON SELECCIÓN CELULAR

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: Febrero 2019	GP-019/INSN-SB/USDXT/PC-V 0.1	Página 1 de 11
---------------------	-------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE CON SELECCIÓN CELULAR

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	¡Error! Marcador no definido.
	3. Consentimiento Informado	4
	b. Conceptos Básicos	4
	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)	8
	a.4. Electroforesis capilar	9
	a.5. Análisis de resultados	9
	b. Indicaciones.....	10
	1. Indicaciones Absolutas	10
	2. Indicaciones Relativas	10
	c. Riesgos o complicaciones	10
	d. Contraindicaciones.....	10
VIII.	Limitaciones y Validez de los Resultados	10
IX.	Recomendaciones	10
X.	Autores, fecha y lugar.....	10
XI.	Anexos	10
XII.	Bibliografía.....	11

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE CON SELECCIÓN CELULAR

I. Título

Guía de procedimiento de Quimerismo en muestra Post Trasplante con selección celular

II. Finalidad

Es útil para determinar las cantidades relativas de donante y receptor en una muestra biológica de un paciente trasplantado. Es un indicador de la efectividad del trasplante. Puede servir como guía en el manejo del paciente y para prevenir un fallo en el injerto o recaída posibilitando la administración oportuna de inmunoterapia adicional. La sensibilidad del estudio es mayor cuando se realiza en diferentes poblaciones de la sangre periférica. En los pacientes sometidos a trasplante de cordón umbilical, la determinación de quimerismo en médula ósea a los 14 días post-trasplante ayuda a predecir el éxito o fallo en el injerto. Para cada análisis de quimerismo postrasplante, se fracciona la sangre del paciente trasplantado en un gradiente de *Ficoll* y posteriormente se selecciona la fracción de granulocitos y la de células mononucleadas de cada una de ellas. A partir de las células mononucleadas se obtiene la población CD3+ (T), CD19 (B), CD66 (Mieloides)

III. Objetivos

a. Objetivo General

Calcular el porcentaje de quimerismo por línea celular T, B, Mieloide.

b. Objetivos específicos

Obtener el porcentaje de quimerismo de Linfocitos T

Obtener el porcentaje de quimerismo de Linfocitos B

Obtener el porcentaje de quimerismo de células Mieloides

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

Análisis de Quimerismo en muestra post trasplante con selección celular

CPT : 81268

CÓDIGO POE : PC-BMOL

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

El análisis de quimerismo de linaje específico, es una herramienta importante para el monitoreo del trasplante alogénico de células hematopoyéticas. Dependiendo de la respuesta del receptor a las células del donante, se puede determinar el estado de quimerismo completo o mixto. El quimerismo en el receptor indica los cambios en la condición el mismo como recaídas y enfermedad injerto contra huésped. El quimerismo seguido de separación celular confiere ventajas sobre el análisis de la población leucocitaria total, como el incremento de la sensibilidad y especificidad ya que si un paciente muestra quimerismo mixto en una o varios linajes celulares, el porcentaje muchas veces no puede ser determinado en ensayos de sangre total,

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE CON SELECCIÓN CELULAR

por tanto, el resultado de quimerismo por linaje difiere entre las poblaciones estudiadas.

2. Consentimiento Informado

No requiere

b. Conceptos Básicos

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. Si la sensibilidad del método para la determinación del quimerismo es del 1 %, y si el 20 % de las células T son del receptor y el resto de las líneas celulares son 100 % del donante, se obtendrían los resultados reflejados en la tabla. Como vemos, cuando se realiza la determinación en médula ósea, el quimerismo resulta ser prácticamente del donante, mientras que en sangre periférica se puede apreciar un quimerismo mixto, pero no se puede determinar la línea celular involucrada, lo que limita la utilidad del análisis. Por último, en las células T aisladas se detecta que una cantidad importante (20 %) de estas es del receptor y este dato, como veremos más adelante, sí es importante para la aplicación de medidas terapéuticas y la predicción del comportamiento de la quimera. El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH), descubierto en los años 50, constituye en la actualidad una herramienta terapéutica para el manejo de enfermedades hematológicas. Con altas tasas de morbi-mortalidad, la enfermedad injerto contra receptor (EICR) es su complicación más importante. El análisis del quimerismo hematopoyético, es decir del porcentaje de celularidad del donante o del receptor tras la infusión del injerto, es utilizado clínicamente para el seguimiento post Alo-TPH, siendo utilizado para predecir diversas complicaciones, más aún cuando éste se lleva a cabo sobre linajes leucocitarios. En este contexto, y conocido el papel de los linfocitos T (CD3+, LT), los leucocitos activados (CD25+, LA) y linfocitos T reguladores (CD4+/CD25+, Tregs) en el Alo-TPH, los Linfocitos B y células Mieloides, el quimerismo en dichos linajes y su implicación en el desarrollo de complicaciones debe ser valorado.

Requerimientos Básicos

- Equipos Biomédicos
 - Analizador Genético ABI 3500
 - Vortex
- Termociclador Veriti
 - Citómetro de Flujo
 - FacsCalibur
 - Magneto de separación celular
 - Congeladora de - 70°C
 - Congeladora de - 20°C
 - Refrigeradora de 2 a 8°C
- Cabina de Bioseguridad
- Centrífuga refrigerada
- Termobloque
- Material médico no Fungible
 - Tips con filtro de 1 – 10 ul
 - Tips con filtro de 20 – 200 ul

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE CON SELECCIÓN CELULAR

- Tips con filtro de 100 – 1000 ul
- Criovirales 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 0.2ml para PCR en tiempo o Real

➤ Material médico Fungible

Reactivos

- Kit de Separación celular para linaje CD3
- Kit de Separación celular para células B
- Kit de Separación celular para células mieloides
- Kit de Extracción de ADN genómico
- Kit de Amplificación de marcadores STR por PCR
- Anticuerpos monoclonales para caracterización de linajes celulares B,T, mieloides

Materiales

- Papel absorbente
- Guantes de nitrilo
- Gafas protectoras

Soluciones

- Etanol Absoluto

➤ Recursos Humanos

- Técnico de laboratorio
- Biólogo
- Médico Patólogo Clínico

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

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 y centrifugación:

Fecha: Febrero 2019	GP-019/INSN-SB/USDXT/PC-V 0.1	Página 5 de 11
---------------------	-------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE CON SELECCIÓN CELULAR

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
 - ✓ QD/01-11-17
 - ✓ QD/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

1QD/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.

a.2. Separación Celular (120 minutos)**a.2.1. Células T**

- Utilizar el Kit de selección positiva para células CD3 humanas.
- Utilizar suspensión de células mononucleares en gradiente de centrifugación
- Resuspender las células a 108 células/mL en PBS.
- En un tubo de 12x75 mm colocar 5ml de la solución de células resuspendidas

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE CON SELECCIÓN CELULAR

- Adicionar 500ul de la solución de anticuerpos monoclonales anti-CD3 a razón de 100uL/ml
- Incubar a temperatura ambiente por 15 min
- Adicionar 250ul de perlas magnéticas a razón de 50uL/ml por muestra
- Incubar a temperatura ambiente por 10 min
- Ubicar el tubo sin tapa y dejar por 5 min a temperatura ambiente
- Invertir el magneto y el tubo por al menos 3 segundos para descartar el sobrenadante
- Resuspender las células en 2.5ml de PBS.

a.2.2. Células Mieloides

- Utilizar el Kit de selección positive para células CD33 y CD66b humanas
- Utilizar suspensión de células mononucleares en gradiente de centrifugación
- Resuspender las células a 108 células/mL en PBS.
- En un tubo de 12x75 mm colocar 5ml de la solución de células resuspendidas
- Adicionar 500ul de la solución de anticuerpos monoclonales anti-CD3 a razón de 100uL/ml
- Incubar a temperatura ambiente por 15 min
- Adicionar 250ul de perlas magnéticas a razón de 50uL/ml por muestra
- Incubar a temperatura ambiente por 10 min
- Ubicar el tubo sin tapa y dejar por 5 min a temperatura ambiente
- Invertir el magneto y el tubo por al menos 3 segundos para descartar el sobrenadante
- Resuspender las células en 2.5ml de PBS

a.2.3. Células B

- Utilizar el Kit de selección positive para células CD19, CD20 humanas
- Utilizar suspensión de células mononucleares en gradiente de centrifugación
- Resuspender las células a 108 células/mL en PBS.
- En un tubo de 12x75 mm colocar 5ml de la solución de células resuspendidas
- Adicionar 500ul de la solución de anticuerpos monoclonales anti-CD3 a razón de 100uL/ml
- Incubar a temperatura ambiente por 15 min
- Adicionar 250ul de perlas magnéticas a razón de 50uL/ml por muestra
- Incubar a temperatura ambiente por 10 min

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE CON SELECCIÓN CELULAR

- Ubicar el tubo sin tapa y dejar por 5 min a temperatura ambiente
- Invertir el magneto y el tubo por al menos 3 segundos para descartar el sobrenadante
- Resuspender las células en 2.5ml de PBS

a.3. Extracción de ADN Genómico a partir de sangre periférica (paciente trasplantado) (60 minutos)**a.3.1. Preparación de reactivos**

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

a.3.2. 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 ul de Sangre total fresca en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 o 2.0 ul.
- Agregar 200 ul de buffer de lisis
- Agregar 30 ul de Proteinasa K
- Adicional 20 ul de RNAasa A
- Mezclar por Vortex (Aproximadamente durante 5 segundos) e incubar a 56 °C por 20 minutos (calor seco)
- Transcurrido el tiempo, adicionar 200 ul de Etanol absoluto y mezclar por Vortex.

a.3.3. Unión a la Columna

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

a.3.4. 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.3.5. Elución

- Agregar 60 ul de Buffer de Elución.
- Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE CON SELECCIÓN CELULAR

- Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Proceder a la Cuantificación del ADN eluído.
- 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.4. 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.
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.5. 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 obtenidos en la PCR.
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, que deben incluir: 1 muestra para monitoreo, 1 muestra blanco, 1 muestra Ladder alélico, 1 control positivo.
5. En caso se cuenten con un número menor de muestras completar los pocillos con 11 ul de formamida.

a.6. Análisis de resultados

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

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE CON SELECCIÓN CELULAR

a.7. 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 en los reservorios adecuados (bolsa roja).
4. Lavarse las manos con jabón desinfectante disponible.

b. Indicaciones**1. Indicaciones Absolutas**

Cuantificación del porcentaje de quimerismo donante según linaje celular: linfocitos B, T, granulocitos en pacientes del servicio de TPH del INSN-SB.

2. Indicaciones Relativas

Cuantificación del porcentaje de quimerismo donante según linaje celular: linfocitos B, T, granulocitos en pacientes de los distintos servicios de trasplante a nivel nacional.

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.
- No válido para cribado de sangre. La carga viral no está pensado para usarse en el cribado de sangre o de productos sanguíneos para identificar la presencia de Hepatitis C Virus.
- Para uso profesional. Este procedimiento es sólo para uso profesional y por personal debidamente formado.

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



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE CON SELECCIÓN CELULAR

XII. Bibliografía

1. 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
2. Sunwen Chou. Approach to Drug-Resistant Cytomegalovirus in Transplant Recipients. Curr Opin Infect Dis. 2015 August ; 28(4): 293–299.
3. Sunwen Chou. Recombinant Phenotyping of Cytomegalovirus UL97 Kinase Sequence Variants for Ganciclovir Resistance. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, June 2010, p. 2371–2378
4. Manual de instrucciones del kit affigene® DNA extraction.