

GUIA DE PROCEDIMIENTO
DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA
REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA)

UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO
SUB UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO
SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA

LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y BIOLOGIA MOLECULAR



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	Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director(e) del Instituto a Nacional de Salud del Niño San Borja

**GUIA DE PROCEDIMIENTO
DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA
PANEL (%PRA)**

I.	Título	3
II.	Finalidad	3
III.	Objetivos	3
	a. Objetivos Generales	3
	b. Objetivos Específicos	3
IV.	Ámbito de aplicación	3
V.	Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT	4
VI.	Consideraciones Generales	4
	a. Definiciones Operativas	4
	1. Definición del Procedimiento.....	4
	2. Aspectos Epidemiológicos importantes.....	4
	3. 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.....	13
	1. Indicaciones Absolutas	13
	2. Indicaciones Relativas.....	13
	c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes:.....	13
	d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:.....	13
	e. Contraindicaciones.....	13
VIII.	Recomendaciones	13
IX.	Autores, Fecha y Lugar	14
X.	Anexos.....	14
XI.	Bibliografía.....	15

GUÍA DE PROCEDIMIENTO

DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA)

I. Título

Guía de procedimiento Determinación del Porcentaje de Anticuerpos Anti-HLA Reactantes contra Panel (%PRA)

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 Porcentaje de Anticuerpos Anti—HLA Reactantes contra Panel (%PRA), mediante la tecnología Luminex xMAP.

III. Objetivos

a. Objetivos Generales

Generar un proceso estandarizado para determinar el Porcentaje de Anticuerpos Anti—HLA Reactantes contra Panel (%PRA), 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.
- Desarrollar una base de datos de pacientes pediátricos peruanos sensibilizados e Hipersensibilizados a los antígenos HLA.
- Promover el desarrollo de protocolos de desensibilización a pacientes hipersensibilizados a antígenos HLA.

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 todos los pacientes pediátricos que estén en lista de espera para trasplante de órgano sólido o trasplante de Progenitores Hematopoyéticos del INSN San Borja.

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

Determinación del Porcentaje de Anticuerpos Anti-HLA Reactantes contra Panel (%PRA)

CPT: 86807

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

La determinación del Porcentaje de Anticuerpos Reactantes contra Panel (PRA), Anti-HLA Clase I y Clase II presentes en el suero del paciente “Receptor” con LABScreen PRA Class I y Clase II se realiza incubando una mezcla de microesferas o “beads” revestidas de antígenos HLA purificados con el suero del paciente. Los complejos Antígenos – Anticuerpos son marcados con anti-IgG humana de cabra conjugada con ficoeritrina (PE). Las señales resultantes son analizadas en un Analizador de flujo LABScan3D™ mediante el software HLA Fusión versión 4.2.

2. Aspectos Epidemiológicos importantes

Los anticuerpos preformados anti-HLA, predisponen a rechazo hiperagudo y constituyen un problema sustancial en el trasplante renal. Los estudios de linfocitotoxicidad dependiente de complemento y la prueba de anticuerpos anti-HLA se realizan antes del trasplante para detectar anticuerpos propios del donante y de este modo reducir significativamente el riesgo de rechazo hiperagudo y agudo. La tasa de rechazos agudos y crónicos en trasplante Renal es del 18% debido a anticuerpos Anti-HLA.

3. Consentimiento Informado

El paciente y/o apoderado debe pasar entrevista con el medico del área para la explicación correspondiente del procedimiento y firmar luego el consentimiento informado del laboratorio.

a. Conceptos Básicos

HLA: Antigenos Leucocitarios Humanos.

Anticuerpos Anti HLA: La producción de anticuerpos frente a moléculas HLA requiere de un estímulo antigénico previo. Este estímulo se produce cuando el sistema inmune de un individuo entra en contacto con células procedentes de otro individuo cuyas moléculas HLA sean diferentes.

La aloinmunización anti-HLA se puede producir durante el embarazo, por transfusiones sanguíneas, o por trasplantes previos.

Rechazo Hiperagudo: Tipo de rechazo inmunológico que sucede minutos u horas después de descampar los vasos del órgano trasplantado. Es debido a la presencia de anticuerpos anti HLA pre-formados.

Rechazo Agudo: Tipo de rechazo que ocurre durante los primeros días después del trasplante, es debido a la activación primaria de células T.

Rechazo Crónico: Rechazo que ocurre meses o años después del trasplante. El mecanismo principalmente involucrado es de tipo humoral por un trastorno de la tolerancia huésped/injerto.

b. Requerimientos Básicos

Equipos Biomédicos:

- Analizador de flujo LABScan3D™.
- Centrífuga para microtubos de 1,5 – 2.0 ml
- Centrifuga para tubos de 12x75 mm.
- Rotador de placas
- Refrigerador 2 – 8 °C
- Congelador de – 30°C
- Congelador de – 70°C
- Homogenizador de tubos tipo Vortex

Materiales Médicos no Fungibles:

- 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
- Cronómetro

Materiales Médicos Fungibles:

- 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
- Gradillas para microtubos de 1.5 – 2.0 ml
- Microtubo estéril de 0.5 ml
- Tubos cónicos estériles de 15 ml
- Films sellador para microplaca de 96 pocillos
- Microplaca de 96 pocillos,
- Cubeta de carga para pipeta multicanal.
- Plumón marcador indeleble, resistente al agua
- Papel absorbente
- Lejía al 10% (o equivalente)

Reactivos de Laboratorio:

- Kit de Detección de Anticuerpos Anti HLA Clase I (LABScreen PRA Class I)
- Kit de Detección de Anticuerpos Anti HLA Clase II (LABScreen PRA Class II)
- Suero de Control Negativo
- Anti-IgG humana de cabra conjugada con PE
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Agua ultrapura grado molecular
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Albúmina de suero bovino (BSA)
- Microparticulas *Adsorb Out*

VII. Consideraciones Específicas

a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:

N° Paso	Descripción de Acciones	Responsable
1	<p>Al iniciar un kit:</p> <p>Tener en cuenta lo siguiente:</p> <p>Una vez que se descongelan las microesferas, NO VOLVER A CONGELARLAS. Almacenarlas de 2–8 °C hasta tres meses o hasta su fecha de caducidad (si es anterior).</p> <p>Después del primer uso, almacene el tampón de lavado de 2–8 °C hasta tres meses o hasta su fecha de caducidad, si es anterior.</p> <p>Si las sales del tampón se han precipitado en la solución durante el envío o el almacenamiento, vuelva a disolverlas calentándola ligeramente antes de preparar la dilución de trabajo.</p>	Biólogo
2	<p>Pre-tratamiento de sueros:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <u>Pre tratamiento con EDTA:</u> <p>Centrifugar los sueros y el Control Negativo a 1600 rpm por 15 minutos.</p> <p>Incubar, en agitación por 15 minutos, 15 ul de cada suero con 10 ul de Solución de EDTA al 0.6% en PBS con BSA al 5%.</p> <ul style="list-style-type: none"> - <u>Pre tratamiento con Adsorb Out:</u> <p>El pre tratamiento con <u>Adsorb Out</u> se realizará cuando la reactividad con la perla de control negativo sea >1500 MFI o cuando la perla de control positivo tenga baja reactividad.</p>	Biólogo

	<p>Centrifugar los sueros y el Control Negativo a 1600 rpm por 15 minutos.</p> <p>Incubar, en agitación por 30 minutos, 40 ul de cada suero con 4 ul de las Beads Adsorb Out.</p> <p>Centrifugar a 15 000 rpm por 5 minutos.</p> <p>Trabajar con el sobrenadante.</p>	
Formación de Complejos Ag-Ab		
3	Mezcle bien las bolas <i>LABScreen PRA Class I y Class II</i> agitando suavemente en vórtex o pipeteando hacia arriba y abajo varias veces antes del uso.	Biólogo
4	Incube en la oscuridad 5 µl de bolas <i>LABScreen PRA</i> con 20 µl del suero PRE TRATADO en cada pocillo de una placa 96 pocillos durante 30 minutos a 20 – 25 °C con agitación suave.	Biólogo
Lavados.		
5	Diluya el tampón de lavado 10X en agua destilada para obtener una solución de lavado 1X.	Biólogo
6	Añada 150 µl de tampón de lavado 1X a cada pocillo de la placa. Cubra con el films para sellar la bandeja y agite suavemente en un vórtex.	Biólogo
7	Centrifugue a 1.300 g durante 5 minutos.	Biólogo
8	Retire el tampón de lavado de los pocillos de la placa invirtiendo la misma “ <i>flicking</i> ”. <i>Sellar la placa y hacer vortex seco.</i>	Biólogo
9	Añada 200 µl de tampón de lavado 1X a cada pocillo de la placa. Cubra con el films para sellar la bandeja y agite suavemente en un vórtex.	Biólogo
10	Centrifugue a 1.300 g durante 5 minutos.	Biólogo

11	Retire el tampón de lavado de los pocillos de la placa invirtiendo la misma <i>“flicking”</i> . Sellar la placa y hacer vortex seco.	Biólogo
12	Añada 200 µl de tampón de lavado 1X a cada pocillo de la placa. Cubra con el films para sellar la bandeja y agite suavemente en un vórtex.	Biólogo
13	Centrifugue a 1.300 g durante 5 minutos.	Biólogo
14	Retire el tampón de lavado de los pocillos de la placa invirtiendo la misma <i>“flicking”</i> . Sellar la placa y hacer vortex seco.	Biólogo
Revelado		
15	Diluya 1 µl por prueba de anti-IgG humana conjugada con PE 100X con 99 µl de tampón de lavado 1X para preparar una solución 1X.	Biólogo
16	Añada 100 µl de anti-IgG humana conjugada con PE 1X a cada pocillo. Cubra con un films para sellar la bandeja y agite suavemente en un vórtex.	Biólogo
17	Incube en la oscuridad durante 30 minutos a 20–25 °C con agitación suave.	Biólogo
18	Centrifugue a 1.300 g durante 5 minutos.	Biólogo
19	Retire el tampón de lavado de los pocillos de la placa invirtiendo la misma <i>“flicking”</i> . Hacer vortex seco.	
20	Añada 200 µl de tampón de lavado 1X a cada pocillo de la placa. Cubra con el films para sellar la bandeja y agite suavemente en un vórtex.	Biólogo
21	Centrifugue a 1.300 g durante 5 minutos.	Biólogo
22	Retire el tampón de lavado de los pocillos de la placa invirtiendo la misma <i>“flicking”</i> . Hacer vortex seco.	Biólogo

23	Añada 80 µl de tampón PBS 1X a cada pocillo. Cubra la placa con un films nuevo y agite suavemente en un vórtex.	Biólogo
24	Proceda a la adquisición y el análisis de los datos o almacene la bandeja a 2–8 °C en la oscuridad hasta 24 horas antes del análisis.	Biólogo
Calibración, lavados y Programación para adquisición de datos del Analizador de flujo utilizando el xPONENT 4.2 Software.		
25	Calibración y Verificación El proceso de calibración debe realizarse periódicamente, según lo establecido por el laboratorio o cada vez que el equipo lo requiera.	Biólogo
26	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.	Biólogo
27	Vortear cada uno de los viales y cargar de 4- 5 gotas de cada uno en los pocillos correspondientes en la placa a utilizar.	Biólogo
28	En el menú de <i>Maintenance</i> desde el programa Xponent 4.2: - En la opción <i>Cmds & routines</i> seleccionar la opción <i>Calibration Verification</i> : 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. - Iniciar el proceso de Calibración haciendo Click en RUN.	Biólogo
29	Lavados Los lavados del equipo se deben realizar antes de iniciar cada proceso y al finalizar los mismos. Al iniciar	Biólogo

	<p>Hacer CLICK en DAILY INSTRUMENT STARTUP:</p> <p>Colocar las soluciones de lavado en los pocillo correspondientes:</p> <p>Alcohol al 70% y solución de lavado (agua destilada).</p> <p>Corroborar que el protocolo de mantenimiento diario cumpla con los siguientes pasos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Warmup - Prime - Lavado con Alcohol Flush (70%) 	
30	<p>Wash x2 (solución de lavado)</p> <p>Hacer click en EJECT para guardar la plataforma e iniciar el proceso con RUN.</p>	Biólogo
31	<p>Adquisición de datos</p> <p>Desde el programa xPONENT 4.2:</p> <p>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:</p> <ul style="list-style-type: none"> - PRA Clase I/# LOTE/FECHA - PRA Clase II/#LOTE/FECHA <p>Seleccione el Protocolo correspondiente al número de lote de reactivo utilizado, ya sea de LS1PRA o LS2PRA para Clase I o Clase II respectivamente.</p>	Biólogo
32	<p>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).</p>	Biólogo

33	Importe la lista de trabajo desde la opción Import List previamente creada en un block de notas y guarde inmediatamente el batch creado.	Biólogo
34	Luego de crear y guardar los batches correspondientes a las pruebas de PRA Clase I y II, haga click en la opción Create a New Multi-Batch , asigne un nombre en Multi-Batch Name y asigne las posiciones en la placa.	Biólogo
35	Coloque la placa en la plataforma XY e inicie la corrida haciendo click en RUN.	Biólogo
36	Proceda con el lavado del equipo.	Biólogo
Lavados del equipo		
37	<p>Al finalizar</p> <p>Hacer CLICK en DAILY INSTRUMENT SHUTDOWN:</p> <p>Colocar la solución de limpieza (hipoclorito al 10%) en la posición correspondiente y verificar que el protocolo de finalización cumpla con los siguientes pasos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sanitize - Wash x2 - Soak <p>Hacer click en EJECT para guardar la plataforma e iniciar el proceso con RUN.</p>	Biólogo
38	Salga de sistema haciendo click en Log off , confirme que se quiere salir del sistema y hacer click en EXIT .	Biólogo
39	Apagar el LABScan3D y Luego el computador.	Biólogo
Análisis de datos		
40	Abrir el programa <i>HLA Fusión 4.2</i> y dar CLICK en <i>LabScreen</i> del menú principal de HLA Fusion Home.	Biólogo
41	Seleccione un archivo de la lista de archivos CSV a importar o	Biólogo

	haga clic en el icono de carpeta arriba de la lista para explorar en busca de archivos CSV LABScreen existentes.	
42	Antes de importar una sesión nueva, seleccione (señale) la muestra de control negativo desde la tabla de detalles de la muestra e indique el tipo de muestra empleada y el pre-tratamiento que haya utilizado.	Biólogo
43	Si es necesario, haga clic en la lista de catálogos de análisis de Fusion disponibles y seleccione el que corresponda al lote de reactivo de LABScreen y Control Negativo utilizado.	Biólogo
44	Haga clic en Close para regresar a la pantalla anterior de importación de datos.	Biólogo
45	En el <i>árbol Navigator</i> , haga clic en un nombre de sesión. Aparece el resumen de la sesión.	Biólogo
46	Haga doble clic en una muestra de la tabla de resumen para ir directamente a la pantalla de análisis para dicha muestra.	Biólogo
47	Haga clic en cualquier encabezado de columna de la tabla de resumen para organizar la tabla de acuerdo con dicha columna. Las flechas en el encabezado de columna indican el orden de organización hacia arriba para el orden ascendente y hacia abajo para el orden descendente.	Biólogo
48	Evaluar el control positivo, debe tener un MFI mayor de 1000.	Biólogo
49	Evaluar el control Negativo, debe tener un MFI muy inferior y la relación de MFI del Control positivo/control negativo de ser mayor a 2.	Biólogo
50	Evaluar las reacciones de X8, X6, X4, X2 y X1.	Biólogo
51	Evaluar los valores de MFI de las muestras para esta	Biólogo

	consideración según el Cutt Off determinado por el laboratorio.	
52	Excluir los antígenos pertenecientes a la tipificación del paciente. Guardar los cambios.	Biólogo
53	Analice las reacciones individualmente con las herramientas del software TAIL ANALYSIS RESULTS y luego con EPITOPE ANALYSIS RESULTS.	Biólogo
54	Guardar el análisis.	Biólogo
REPORTE Y EMISIÓN DE RESULTADOS		
55	Elaboración del Reporte de Resultados según Modelo del Laboratorio. <i>Ver Anexo N°01: Reporte de Resultados.</i>	Biólogo/ Médico Patólogo Clínico
56	Validación de resultados y correlación clínico-patológica	Médico Patólogo Clínico
FINAL DEL TRABAJO		
	<ol style="list-style-type: none"> 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). 4. Lavarse las manos con jabón desinfectante disponible. 	Biólogo

b. Indicaciones

1. Indicaciones Absolutas

- Pacientes en lista de espera para trasplante de órgano sólido (Riñón, hígado).
- Paciente receptor y donante candidato a trasplante de Progenitores Hematopoyéticos.

2. Indicaciones Relativas

Según indicación clínica del médico tratante que solicita el estudio.

c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes:

No aplica para este procedimiento

d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:

No aplica para este procedimiento

e. Contraindicaciones

No aplica para este procedimiento

VIII. Recomendaciones

- El paciente debe pasar entrevista con el médico o profesional de la salud responsable del llenado de la ficha epidemiológica del laboratorio.
- La toma de muestra debe ser en ayunas.
- En el caso de pacientes Hemodializados la toma de muestra debe ser después del periodo más largo entre diálisis.
- Esperar un periodo de 7-10 días desde la última transfusión, en el caso de pacientes politransfundidos.
- Tener presente algún evento sensibilizante al que haya estado expuesto el paciente.

IX. Autores, Fecha y Lugar

Nombre del Ejecutor responsable: Blga. Madeley Aliaga Zamudio

Fecha, hora y Lugar del procedimiento: Abril 2019 – Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular – Servicio de Patología Clínica – INSN San Borja.

Fecha de elaboración y vigencia del protocolo: Abril 2019, vigencia: tres (03) años.

Lista de Autores y correos electrónicos:

Madeley Karín Aliaga Zamudio MsC(c); maliaga@insnsb.gob.pe

Carla Elizabeth Méndez Rodríguez Chacón MD; cmendez@insnsb.gob.pe

Luis Martin Cruz Díaz MsC(c); lcruz@insnsb.gob.pe

Luis Eduardo Grados Molina; lgrados@insnsb.gob.pe

Andrea de María Zavaleta Gonzales MD; azavaleta@insnsb.gob.pe

X. Anexos**PERÚ****Ministerio
de Salud****instituto Nacional de Salud
del Niño – San Borja**

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

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

REPORTE DE RESULTADO**PORCENTAJE DE ANTICUERPOS REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA)**

Nombre	Condición	Edad	HC	Nº Movimiento
Diagnóstico	Servicio solicitante	Medico solicitante		

**Datos del estudio**

Metodología:	Citometria de Flujo (LUMINOMETRIA)
Sistema:	LABScreen PRA Class I and Class II (IVD)
Tipo de muestra:	
Fecha de Toma De muestras:	
Analista Responsable:	
Medico Responsable:	

RESULTADO

PRA (%)	
Clase I	
Clase II	

Comentario: _____

XI. Bibliografía

1. Ali A, Al-Kaisi A, Ali I. Clinical Relevance of Pretransplant Testing for Anti-Human Leukocyte Antigen Antibodies in Iraqi Renal Transplant Patients. *Exp Clin Transplant*. 2019 Jan; 17(Suppl 1):164-168.
2. Argani H, Anti-HLA Antibody: The Role of Epitopes in Organ Transplantation. *Exp Clin Transplant*. 2019 Jan; 17(Suppl 1):38-42.
3. Timofeeva OA, Donor-Specific HLA Antibodies as Biomarkers of Transplant Rejection. *Clin Lab Med*. 2019 Mar; 39(1):45-60.
4. Gladstone DE, Bettinotti MP, HLA donor-specific antibodies in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: challenges and opportunities. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017 Dec 8;2017(1).
5. Eng H, Bennett G, Tsiopelas E, Lake M, Humphreys I, Chang S, et al. Anti-HLA donor-specific antibodies detected in positive B-cell crossmatches by Luminex predict late graft loss. *Am J Transplant*. 2008; 8:2335–42.
6. LABScreen PRA Class I and Class II. Product insert. One Lambda, INC.
7. Adsorb Out. Product insert. One Lambda, INC.
8. Terasaki, P.I.; Cai, J. Humoral therapy of transplantation: further evidence. *Curr. Opin. Immunol*. 2005, 17(5), 541-545.