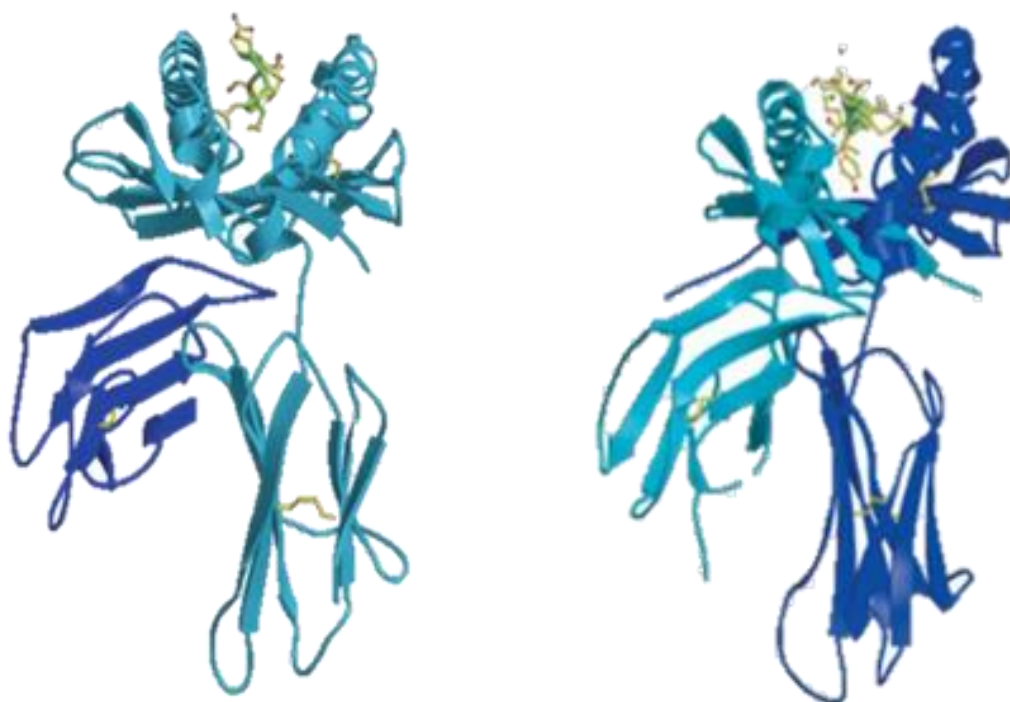


GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

Guía de Procedimiento: Tipificación Molecular de Genes HLA Clase I (Locus A,B,C) y Clase II (Locus DRB1 y DQB1) por Reacción en Cadena de la Polimerasa e Hibridación con Sondas de Oligonucleótidos de Secuencia Específica (PCR-SSO)

Unidad de soporte al Diagnóstico y tratamiento
Sub Unidad de soporte al Diagnóstico
Servicio de Patología Clínica

Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología 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 TratamientoSub Unidad de Soporte al DiagnósticoUnidad de Gestión de la Calidad	Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director del Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

Guía de Procedimiento: Tipificación Molecular de Genes HLA Clase I (Locus A,B,C) y Clase II (Locus DRB1 y DQB1) por Reacción en Cadena de la Polimerasa e Hibridación con Sondas de Oligonucleótidos de Secuencia Específica (PCR-SSO)

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	4
	a. Definiciones Operativas	4
	1. Definición del Procedimiento.....	4
	2. Consentimiento Informado.....	4
	b. Conceptos Básicos	4
	c. Requerimientos Básicos	9
VII.	Consideraciones Específicas	11
	a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento.....	11
	b. Indicaciones.....	27
	1. Indicaciones Absolutas	27
	2. Indicaciones Relativas.....	27
	c. Riesgos o complicaciones frecuentes.....	27
	d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes	27
	e. Contraindicaciones.....	27
VIII.	Recomendaciones	27
IX.	Autores, fecha y lugar.....	28
X.	Anexos	¡Error! Marcador no definido.
XI.	Bibliografía.....	29

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

Guía de Procedimiento: Tipificación Molecular de Genes HLA Clase I (Locus A,B,C) y Clase II (Locus DRB1 y DQB1) por Reacción en Cadena de la Polimerasa e Hibridación con Sondas de Oligonucleótidos de Secuencia Específica (PCR-SSO)

I. Título

Guía de Procedimiento: Tipificación Molecular de genes HLA Clase I (Locus A, B, C) y Clase II (Locus DRB1 y DQB1) por reacción en cadena de la polimerasa e hibridación con sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (PCR-SSO).

II. Finalidad

Establecer los procedimientos para la identificación o tipificación molecular de genes HLA de clase I (locus A, B y C) y clase II (locus DRB1 y DQB1) comunes y bien documentados (CWD) por la metodología de Reacción en Cadena de la Polimerasa e Hibridación con Sondas de Oligonucleótidos de Secuencia Específica (PCR-SSO), en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Servicio de Patología Clínica del INSN - San Borja.

III. Objetivos

a. Objetivo General

Realizar el proceso de tipificación molecular de genes HLA de clase I (locus A, B y C) y clase II (locus DRB1 y DQB1) comunes y bien documentados (CWD) por la metodología de Reacción en Cadena de la Polimerasa e Hibridación con Sondas de Oligonucleótidos de Secuencia Específica (PCR-SSO).

b. Objetivos específicos

- Establecer el flujo de trabajo desde la obtención de la muestra hasta la validación de los resultados.
- Identificar de forma detallada los procedimientos necesarios para la optimización del tipaje de genes HLA en los pacientes del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja.

IV. Ámbito de aplicación

El presente procedimiento será aplicado por el laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Servicio de Patología Clínica del INSN - San Borja

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

Tipificación molecular HLA – A, B, C, DR, DQ – SSO en resolución intermedia.

CPT: 8681201

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 3 de 34
------------------	--------------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

Los procesos de tipificación molecular de genes HLA por sondas de oligonucleótidos secuencia específica (SSO) como LABType® aplica la tecnología Luminex® donde el ADN extraído se amplifica por PCR utilizando un primer específico. El producto de PCR está biotinilado, lo que permite su detección con estreptavidina conjugada con r-ficoeritrina (SAPE).

El producto de PCR se desnaturaliza y vuelve a hibridar con sondas de ADN complementarias conjugadas con microesferas cifradas de forma fluorescente. Un analizador de flujo, LABScan3D, identifica la intensidad de fluorescencia de la PE (ficoeritrina) en cada microesfera.

Las sondas que permiten la tipificación de los genes HLA dentro del sistema ADN LABType™ CWD están destinadas a genes de Clase I ya que amplifican y reconocen exones adicionales, proporcionando una resolución extendida, ya que además de los exones 2 y 3, los productos de tipificación de locus A y B de Clase I apuntan a los polimorfismos en los exones 4 y 5. El locus C de Clase I amplifica los exones 4, 5, 6 y 7. El producto DRB1 de Clase II solo amplifica y apunta al exón 2, por lo cual la única diferencia es el uso de más microesferas magnéticas.

La asignación de la tipificación de HLA se basa en el patrón de reacción comparado con patrones asociados a secuencias de genes HLA publicadas, asimismo las sondas que tipificarán alelos HLA comunes y bien documentados tienen un registro en el catálogo CWD actual que está disponibles en la base de datos IMGT/HLA (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>).

2. Consentimiento Informado

El paciente o Tutor (según sea el caso) deberá manifestar su consentimiento para la realización de la prueba, almacenamiento de la muestra y uso posterior de la misma a fin de ampliar los estudios del caso mediante la firma del Consentimiento Informado del Laboratorio. Ver anexo N°01: Consentimiento Informado.

b. Conceptos Básicos

El conocimiento del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) sigue ampliándose desde hace más de 50 años se describió por primera vez un gen

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 4 de 34
------------------	--------------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

responsable del rechazo agudo de trasplantes. Los hitos fundamentales de este conocimiento han sido:

- La asociación de los genes de histocompatibilidad con antígenos de membrana de los leucocitos
- La descripción del polimorfismo y de la complejidad genética del sistema.
- La vinculación de estos genes y sus productos con los fenómenos de restricción de la respuesta inmune, y el lugar central que ocupa en el control de la respuesta inmune.
- La asociación de algunos de los alelos con ciertas enfermedades.

Definición de HLA

El MHC en el humano se denomina sistema HLA ('Human Leukocyte Antigens') y está integrado por un conjunto de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (entre los marcadores 6p21.31 y 6p21.32), en un segmento de 4000 kb que corresponde únicamente al 1/1000 del genoma humano total. Los genes del MHC permiten la clasificación de tres regiones, caracterizadas por codificar tres tipos de proteínas con diferentes funciones, denominadas de clase I, II y III. Las moléculas de clase I y II representan entidades estructurales diferentes, aunque todos los productos de estos genes pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, e intervienen en los procesos de activación linfocitaria y restricción de la respuesta T. La región de clase III está integrada por los genes que codifican moléculas de complemento (C2, C4A, C4B y factor B) y las isoenzimas de la 21-hidroxilasa. Entre la región de clase III y la de clase I existen un grupo de genes que codifican proteínas relacionadas con situaciones de estrés, inflamación o infección, que se consideran como una región diferente atendiendo a su función (región de clase IV). En esta región se encuentran los genes para las proteínas del choque térmico de 70 KDa (hsp70, 'Heat shock protein'), algunas citoquinas como la linfotóxina α (LTA) también llamada TNF- β ('Tumor Necrosis Factor'), la linfotóxina β (LTB); y otros.

Características del Sistema HLA

• Codominancia y fenotipo

Los alelos del sistema HLA se expresan de forma codominante. Esto es, en la membrana celular se presentan los productos de ambos alelos (del alelo materno y del alelo paterno). Por lo tanto, para cada uno de los loci encontraremos individuos homocigotos (ambos alelos codifican el mismo producto) o heterocigotos (alelos diferentes). La relación de antígenos expresados por un individuo se denomina fenotipo HLA.

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 5 de 34
------------------	--------------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

- **Haplotipos, segregación y genotipo**

La estrecha unión de estos genes hace que estos se transmitan juntos, en bloque de padres a hijos. Por cada progenitor existen dos series de genes (uno por cromosoma) llamados haplotipos. Un individuo hereda dos haplotipos de los cuatro posibles: 2 del padre (a y b) y 2 de la madre (c y d). De ello resultan 4 posibles combinaciones filiales: a/c, a/d, b/c y b/d, por lo que la probabilidad que dos hermanos sean HLA idénticos es del 25%, de que sean HLA diferentes del 25% y de que sean HLA semiidénticos o haploidentícos del 50%. En ocasiones ocurre una recombinación entre dos haplotipos originando uno nuevo, pero la tasa de recombinaciones es del 1%. Al conjunto de los dos haplotipos, individualizados, que posee un individuo se le denomina genotipo.

- **Desequilibrio de ligamiento**

Muchas y diferentes especificidades pueden ser detectadas para cada locus génico en la población humana. Puesto que virtualmente cualquier antígeno de la región A puede asociarse con cualquiera de la región B, C o D, el número de haplotipos presentes en la población humana es muy elevado. Sin embargo, ciertas combinaciones de especificidades de A y B ocurren con más frecuencia que la esperada si su asociación fuese al azar. Así, la frecuencia de la combinación de A1 y B8 es del 8.8% en la población, mayor que la esperada que es del 1.6% (frecuencias de 16% para A1, y 10 % para B8; $0'16 \times 0'10 = 0'016$ ó 1.6%). Tales agrupaciones de especificidades se denominan desequilibrio de unión o ligamiento. Este fenómeno no es infrecuente, se puede producir entre los loci A y B, B y C, B y DR o DR y DQ. Más infrecuente, pero también ocurre, es el desequilibrio entre más de dos especificidades de loci distintos.

- **Polimorfismo alélico**

El polimorfismo se debe a la existencia de un gran número de alelos para cada uno de esos genes. La diversidad genera una gran cantidad de combinaciones en un cromosoma, lo que hace extremadamente difícil hallar dos personas no emparentadas con HLA idéntico. Los genes de histocompatibilidad son los genes más polimórficos encontrados hasta el momento del genoma de todas las especies analizadas. El polimorfismo de los antígenos HLA ocurre, como ya hemos visto a varios niveles: 1) múltiples loci relacionados, y 2) múltiples alelos.

- **Zonas variables**

La mayor parte de la variabilidad se concentra en el exón 2 de los genes de clase II y en los exones 2 y 3 de los genes de clase I. Dentro de estos exones, la variabilidad esta a su vez concentrada en determinadas posiciones, las cuales están implicadas directa ó indirectamente en la región de unión al péptido antigénico. Por otra parte, las variantes alélicas se pueden agrupar en familias de alelos. Estas familias están

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

inmiscuidas entre especies; esto es, un determinado alelo presenta mayor homología con miembros de su familia, aún en especies más o menos próximas, que con otros alelos de su especie. Esto ha permitido construir los linajes alélicos y seguir el proceso de divergencia filogenética.

Compatibilidad HLA

- **Compatibilidad e Incompatibilidad**

Las coincidencias en antígenos HLA (compatibilidades) o las diferencias en los mismos (incompatibilidades) se recogen siempre que hablamos de injertos de órgano sólido en la dirección receptor anti-donante. De esta forma, las homocigosis en algún locus del donante o los antígenos blanco (no definidos), en el caso de los fenotipos, implicarán como máximo 1 incompatibilidad desde el punto de vista del receptor. Los términos se han extendido a la valoración de fragmentos del alelo (epitopos) o a residuos individuales de la secuencia del alelo. En general, para el estudio de la implicación del HLA como factor de riesgo sobre la supervivencia del injerto/paciente, se refieren las incompatibilidades.

- **Incompatibilidades Mayores y Menores**

Incompatibilidades menores se refieren a aquellas entre antígenos que pertenecen al mismo grupo antigénico público, mientras que en las mayores los antígenos corresponden a grupos públicos diferentes.

- **Grupos de Reaccion Cruzada (CREGs)**

Los antígenos que presentan reacción cruzada con los antisueros de los individuos sensibilizados definen los grupos de reacción cruzada o CREGs. Los antígenos incluidos en un CREG suelen compartir una o más secuencias de aminoácidos en sus regiones de variabilidad. No sucede lo mismo, al contrario, antígenos que comparten secuencias variables no tienen por qué pertenecer al mismo CREG. Esta diferencia la establece la misma definición de los CREG: son grupos definidos por antisueros, que sólo discriminan epitopos expuestos.

Estrategias utilizadas en el estudio de compatibilidad

El tipaje HLA se encuentra comprometido con la deseable resolución máxima y los recursos disponibles en los laboratorios de tipaje. Sin embargo, la combinación de diversas técnicas que por sí mismas son insuficientes, se consigue una aproximación bastante satisfactoria.

La definición de la relación receptor-donante siempre es relativa al método utilizado en la caracterización de los antígenos HLA.

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 7 de 34
------------------	--------------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

- **Baja resolución**

La serología permite la descripción de especificidades antigénicas; entre ellas cabe distinguir aquellas más restringidas a uno o varios alelos ('splits') de las que están presentes en un gran número de los mismos o incluso en grupos de alelos adscritos a diferentes 'splits' (especificidades públicas, amplias o 'broad', y más generales aun las que definen los grupos de reactividad cruzada o 'CREGs' y las definidas como BW4 y BW6).

El tipaje por técnicas Biología Molecular de baja resolución alcanzan la resolución serológica (baja resolución), pero si pueden en muchos casos garantizar la presencia de homocigosis, o despistar ambigüedades serológicas.

- **Mediana resolución**

Se alcanza este nivel de resolución por técnicas de Biología molecular, donde se identifican un grupo de alelos probables, no se puede identificar específicamente el alelo que porta el individuo. Estos grupos de alelos están designados por un conjunto de letras o códigos del NMDP (National Marrow Donor Program).

- **Alta resolución**

La Biología Molecular de alta resolución permite la definición de alelos HLA, aunque según el método empleado presenta diferentes particularidades:

SSP (Amplificación específica): los alelos nuevos pueden confundirse bien porque no amplifican con los 'primers' escogidos, bien porque presenten la misma secuencia de amplificación.

SSP/SSO (Amplificación genérica + Hibridación específica): los alelos nuevos pueden quedar resaltados como incongruencias en la combinación de sondas positivas.

Secuenciamiento Sanger y NGS: La secuenciación de amplicones de los alelos de HLA es probablemente el mejor método para conocer qué alelo u alelos están presentes en un individuo, e incluso para descubrir nuevos alelos. En NGS existen diferentes plataformas que permiten que manejar el estudio en distintos enfoques:

- Tecnologías de reads cortas como Illumina. En este caso la mejor estrategia y la más segura sería la amplificación de exones y su posterior secuenciación.
- Utilizando PacBio se podría aplicar la estrategia de amplificar los genes HLA enteros. En este caso, se debería tener en cuenta que de los alelos de HLA conocidos sólo se conoce en realidad la secuencia de algunos de sus exones, y no la de los genes enteros. Sin embargo, es posible utilizar sólo la información de los exones.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

c. Requerimientos Básicos

Infraestructura

- Área de Pre-PCR, PCR y Post-PCR

Recursos Humanos

- Médico patólogo Clínico capacitado y entrenado en técnicas de Histocompatibilidad, Inmunología y Biología molecular.
- Biólogo especialista en Histocompatibilidad y Biología molecular.
- Técnico de Laboratorio capacitado en procedimientos de Histocompatibilidad.

Paciente

- El paciente o Tutor (según sea el caso) deberá manifestar su consentimiento para la realización de la Prueba con el posterior almacenamiento de la muestra mediante la firma del Consentimiento Informado del Laboratorio. Ver anexo N°01: Consentimiento Informado
- El paciente y/o Tutor (según sea el caso) deberá pasar una entrevista a cargo del Médico responsable del llenado de la Ficha Epidemiológica del laboratorio. Ver anexo N°02: Ficha Epidemiológica del Receptor y Anexo N°03: Ficha Epidemiológica del Donante.
- El paciente y los donantes deben de cumplir con las indicaciones dadas en la presente Guía para la realización de la prueba.
- Solicitud escrita de cada uno de los potenciales donantes: Nombre del paciente receptor, edad, servicio que envía la orden, médico tratante del receptor, fecha.

Muestra biológica

- Sangre periférica en tubo al vacío con EDTA de 3 ml (02 tubos), debidamente identificada con nombre y fecha de la toma de muestra.
- Cabello tomado bajo condiciones estériles (20 cabellos), este debe tener el bulbo piloso adjunto a la raíz; el tubo donde se colecte debe estar debidamente identificado con nombre y fecha de la toma de muestra

Equipos Biomédicos

- Espectrofotómetro de UV-Vis Nanodrop™ 2000
- Analizador de flujo LABScan3D™
- Centrífuga para microtubos de 1,5 – 2.0 ml
- Centrífuga de micro placas de 96 pocillos
- Termociclador en gradiente Veriti
- Refrigerador 2 – 8 °C
- Congelador de – 30°C
- Congelador de – 70°C

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

- Cámara electroforética
- Transiluminador UV.
- Termobloque de calor seco
- Vortex
- Micropipeta automáticas de 1 – 10 µl
- Micropipeta automáticas de 2 – 20 µl
- Micropipeta automáticas de 10 – 100 µl
- Micropipeta automática de 100– 1000 µl
- Pipeta multicanal de 0.5 – 10 µl
- Pipeta multicanal de 20 – 300 µl
- Computadora
- Impresora

Materiales

- Tips con filtro de 1 – 10 µl
- Tips con filtro de 2 – 20 µl
- Tips con filtro de 20 – 200 µl
- Tips con filtro de 100 – 1000 µl
- 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
- Film sellador para microplaca de PCR de 96 pocillos
- Microplaca de 96 pocillos,
- Plumón marcador indeleble, resistente al agua
- Papel absorbente
- Cronómetro

Insumos

- Etanol Absoluto
- Agua ultrapura grado molecular
- Etanol al 70%.
- Lejía al 10% (o equivalente)
- Agarosa
- Buffer TAE
- Colorante de carga
- SYBR® Safe
- Parafilm

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

- Kit de Calibración Flex Map 3D®
- Kit de Verificación de Rendimiento Flex Map 3D®

Reactivos

- Kit de extracción de ADN genómico
- Kit de tipificación molecular CWD HLA Clase I locus A-SSO
- Kit de tipificación molecular CWD HLA Clase I locus B-SSO
- Kit de tipificación molecular CWD HLA Clase I locus C-SSO
- Kit de tipificación molecular CWD HLA Clase II locus C-SSO
- Kit de tipificación molecular HLA Clase II locus DQA1/DQB1-SSO

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

El procedimiento de tipificación molecular de los genes HLA descrito en el presente manual consta de las siguientes fases:

1. Extracción de ADN Genómico	Biólogo
2. Cuantificación de ADN	
3. Tipificación Molecular de Genes HLA Clase I y Clase II comunes y bien documentados (CWD) en resolución intermedia por Reacción en Cadena de la Polimerasa e Hibridación con Sonda de Oligonucleótidos Secuencia Específica (PCR-SSO).	
3.1 Amplificación de ADN por PCR	
3.2 Electroforesis en gel	
3.3 Hibridación con sondas SSO CWD	
4. Calibración y Programación del LABScan 3DTM usando el Software Luminex Xponente	Médico Patólogo
5. Análisis de datos mediante el Software HLA Fusión 4.2	
6. Emisión de Reporte	
7. Emisión de Resultados	Médico Patólogo
8. Validación Clínica Patológica	

a.1. Extracción de ADN genómico**a.1.1. Extracción de ADN genómico a partir de Sangre Periférica**

La extracción de ácidos nucleicos es el primer paso para todos los procedimientos de Biología Molecular en los que se analice ADN o ARN. El kit de extracción de ADN genómico Purelink permite aislar y purificar ADN desde sangre total fresca o congelada; así como a partir de otras muestras biológicas como tejidos, hisopado bucales, tacos de parafina, cola de ratón/rata, etc.

El método está basado en la unión selectiva del ADN a la membrana de sílica en presencia de sales caotrópicas. Consta de los pasos de lisado

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 11 de 34
------------------	--------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

(digestión con Proteinasa K y acción de ARNasa A), unión a la membrana de silica, lavados con Buffers y Elución con Buffer de Elución bajo en sales. El ADN extraído es de un tamaño de 20-50 kb y permite trabajar con técnicas de PCR, Enzimas de restricción y Southern blotting.

Al inicio del proceso:

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:

1. Al abrir un nuevo kit, 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.
2. Cargar 200 µl de Sangre total fresca o congelada en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 o 2.0 ml.
3. Agregar 20 µl de Proteinasa K
4. Adicional 20 µl de RNAasa A
5. Mezclar por Vortex (Aproximadamente durante 5 segundos)
6. Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
7. Agregar 200 µl de Buffer Binding/lisis y mezclar bien hasta obtener una solución homogénea.
8. Incubar a 56 °C por 10 minutos (calor seco).
9. Adicionar 200 µl de Etanol absoluto.
10. Mezclar por Vortex (Aproximadamente durante 5 segundos)
11. Cargar el lisado en una columna de extracción (aprox. 640 µl) utilizando una pipeta de transferencia estéril.
12. Centrifugar la columna a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

13. Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un nuevo tubo de colección.
14. Agregar 500 µl de Wash Buffer 1 (Previamente preparado).
15. Centrifugar la columna a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
16. Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un nuevo tubo de colección
17. Agregar 500 µl de Wash Buffer 2
18. Centrifugar la columna a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente.
19. Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml.
20. Agregar 60 µl de Buffer de Elución.
21. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
22. Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.
23. Proceder a la Cuantificación del ADN eluído.
24. 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 proceso:

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.

a.1.2. Extracción de ADN genómico a partir de Bulbo Piloso

El método está basado en la unión selectiva del ADN a la membrana de sílica en presencia de sales caotrópicas. Consta de los pasos de lisado (digestión con Proteinasa K y acción de ARNasa A), unión a la membrana de sílica, lavados con Buffers y Elución con Buffer de Elución bajo en sales. Las muestras de cabello tienen tasa de éxito de extracción de ADN bastante alta, por lo que si los cabellos contienen el bulbo piloso, se tiene una probabilidad del 75% para extraer el ADN necesario.

Al inicio del proceso:

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).

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 13 de 34
------------------	--------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

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:

1. Rotular en orden ascendente el número de crioviales necesarios según la lista del trabajo del día.
2. Añadir al tubo colector de 2 ml que contiene las muestras de cabello con folículo piloso lo siguiente:
 - Agregar 200 µL de buffer de lisis de tejidos
 - Agregar 30 µL de Proteinasa K
 - Agregar 20 µL de Dithiothreitol (DTT) 1M de buffer de lisis de tejidos.
3. Mezclar por Vórtex e incubar a 56°C por 90 minutos.
4. Transcurrido el tiempo, adicionar 200 µL de Buffer de Lisis Secundario. Mezclar por Vórtex e incubar a 70°C por 20 minutos.
5. Adicionar al lisado 150 µL de etanol absoluto y mezclar por vórtex.
6. Cargar el lisado en una columna de extracción (aprox. 640 µL) utilizando una pipeta de transferencia estéril.
7. Centrifugar la columna a 10 000 g por 1 minuto a temperatura ambiente.
8. Descarte el tubo de colección y coloque la columna a un nuevo tubo de colección.
9. Agregar 500 µL de Wash Buffer 1
10. Centrifugar la columna a 10 000 g por 1 minuto a temperatura ambiente.
11. Descarte el tubo de colección y coloque la columna a un nuevo tubo de colección.
12. Agregar 500 µL de Wash Buffer 2
13. Centrifugar la columna a 10 000 g por 1 minuto a temperatura ambiente.
14. Descarte el tubo de colección y coloque la columna a un nuevo tubo de colección.
15. Agregar 500 µL de Etanol Absoluto
16. Centrifugar la columna a 10 000 g por 1 minuto a temperatura ambiente.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

17. Descarte el tubo de colección y coloque la columna a un nuevo tubo de colección.
18. Centrifugar la columna a 18 000 g por 3 minutos a temperatura ambiente.
19. Descarte el tubo de colección y coloque la columna a un tubo estéril de 1.5 ml.
20. Agregar 50 µL de Buffer de Elución.
21. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
22. Centrifugar la columna a 18 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente.
23. Proceder a la Cuantificación del ADN eluído.
24. 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 proceso:

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.

a.2. Cuantificación de ADN genómico

La cuantificación del ADN y/o ARN, se lleva a cabo mediante técnicas de espectrofotometría de luz ultravioleta, ya que estas biomoléculas en solución tienen su pico máximo de absorción a 260 nm. De manera que la cantidad de luz absorbida se relaciona a la concentración de la molécula absorbente.

Es común que las muestras de ácidos nucleicos puedan contener otras moléculas como por ejemplo proteínas, las cuales absorben la luz UV a los 280 nm. El cociente obtenido a 260 nm y a 280 nm (A260/A280) proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleicos. Una pureza de 1.8 – 2.0 es considerada ideal para trabajar en los procedimientos de Biología molecular.

Al inicio del proceso:

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).

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 15 de 34
------------------	--------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

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 Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 y el computador conectado al equipo.
2. Iniciar el software de control NanoDrop 2000, se observará una ventana que pide autorización para que el programa realice cambios en el equipo, pulsar sí y el equipo hará un chequeo del sistema óptico
3. Seleccionar el tipo de ensayo (Ácidos Nucleicos) en el software.
4. Levantar la cubierta del Nanodrop 2000 y limpiar el pedestal de lectura con 1 µL de agua libre de nucleasas, cerrar la cubierta, abrirla y limpiar con papel toalla de hoja delgada.
5. Leer 1 µL del blanco, que debe ser el mismo buffer donde fue eluida la muestra de ADN, y dar click en Blank dentro del software.
6. Colocar 1 µL de la muestra, indicar el nombre de la misma y dar click en el botón de Measure (Lectura) en el software.
7. Anotar los valores de Concentración y Pureza que aparecen en una hoja de datos que se muestra en la parte inferior de la pantalla con el nombre de la muestra, los valores de las lecturas y la fecha.
8. Para leer una nueva muestra se debe limpiar con 1 µL de agua libre de nucleasas colocando este volumen sobre la platina, abriendo y cerrando la cubierta y limpiando después.
9. Al terminar las lecturas, hacer la limpieza con 1 µL de etanol al 70% y luego con agua libre de nucleasas

a.3. Tipificación molecular de genes HLA Clase I y Clase II comunes y bien documentados (CWD) en resolución intermedia por reacción en cadena de la polimerasa e hibridación con sonda de oligonucleótidos de secuencia específica (PCR-SSO)

Los Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA) son un conjunto de moléculas implicadas en la presentación de antígenos a los linfocitos T y en la diferenciación de lo propio y lo ajeno en el sistema inmunitario.

Estos antígenos HLA están codificados por un conjunto de genes altamente polimórficos ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 y constituyen la principal barrera al trasplante de órganos y de células hematopoyéticas.

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 16 de 34
------------------	--------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

En la actualidad se han desarrollado varias metodologías para poder identificar cada uno de los alelos HLA de un individuo, desde métodos serológicos utilizando anticuerpos monoclonales (test de linfocitotoxicidad) hasta métodos moleculares como PCR-SSP, PCR-SSO y secuenciamiento.

Al inicio del proceso:

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.

a.3.1. Amplificación de ADN por PCR

1. Realizar diluciones al ADN genómico cuantificado con agua molecular para ajustar la concentración a 20 ng/μl. 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.

NOTA: Para la realización de la PCR se requiere que el ADN extraído tenga una concentración de – 20 ng/μl, y una pureza entre 1.65 a 1.90.

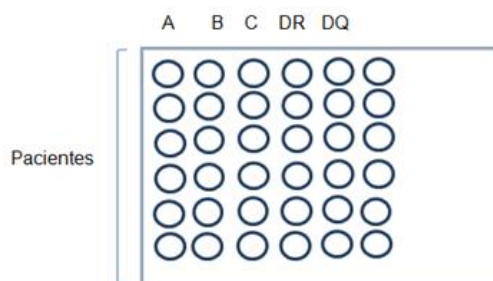
2. Preparación la mezcla de PCR por cada locus (A, B, C, DRB1 y DQB1) utilizando un microtubo de 0.5 ml de la siguiente manera:

Tabla N° 01: Reactivos para preparar la mezcla de PCR

Nº de Reacciones	PRIMER (μl)	DMIX (μl)	TAQ (μl)
1	4	13.8	0.2
5	20	69	1
10	40	138	2
20	80	276	4
50	200	690	1
100	400	1380	20

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

3. Dispensar 2 μL del ADN extraído a cada pozo de la placa de PCR según corresponda. Protéjalos de la evaporación o contaminación tapándolos parcialmente.



4. Agregar 18 μL de la mezcla de PCR (Dmix/Primer/Taq) a los pozos de la placa de PCR que contienen el ADN extraído. Recuerde de anotar la posición de cada muestra.
5. Sellar bien la placa de PCR con el film correspondiente.
6. Colocar la placa en el Termociclador previamente programado con el Programa de amplificación LABType SSO PCR respectivo, el cual se detalla líneas abajo.

Tabla N° 02: Programa de Amplificación LABTYPE CWD SSO PCR

96°C	3 min	1 hold
96°C	20 s	5 ciclos
60°C	20 s	
72°C	20 s	
96°C	10 s	30 ciclos
60°C	15 s	
72°C	20 s	
72°C	10 s	1 hold
4°C	Infinito	

7. Realizar el corrido de electroforesis usando de 2-5 μL 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.3.2. Electroforesis en gel

1. Disolver 1.25 g 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.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

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).
6. En una superficie de parafilm dispensar 2,5 µl de cada amplificado y mezclar con el buffer de carga o azul de bromofenol.
7. Dispensar cada mezcla en los pocillos del gel correspondientes.
8. Conectar los electrodos en las posiciones correspondientes (polo positivo o cátodo en la parte inferior y polo negativo o Ánodo en la parte superior)
9. Encender la fuente poder y programar la corrida a un voltaje constante de 210 V por 40 minutos.
10. Realizar la corrida electroforética por el voltaje y tiempo programado.
11. Sumergir el gel en una cubeta que contenga el colorante de tinción de ADN (SYBR Safe) disuelto en buffer TAE.
12. Dejar colorear por aproximadamente 15-20 minutos.
13. Retirar el gel con cuidado que no se quiebre y colocarlo en el transiluminador.
14. Encender el transiluminador y observar la presencia de las bandas correspondientes a los exones 2+3 (2 BANDAS) para los genes de clase I y el exón 2 para los genes de clase II (1 BANDA).
15. Tomar registro del gel para su archivo correspondiente.
16. Eliminar el gel y guante utilizados en el reservorio correspondiente.
17. Vaciar el buffer de corrida en un reservorio limpio con tapa hasta su próximo uso.
18. Secar la cámara electroforética utilizando un paño absorbente.

a.3.3. Hibridación con sondas SSO CWD

1. Preparar los reactivos para la hibridación, tener en cuenta las siguientes consideraciones:
 - Las Perlas para cada locus, el Buffer de Hibridación y el Buffer SAPE son susceptible a luz, mantenerlos en oscuridad.
 - El buffer 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.

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 19 de 34
------------------	--------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

Tabla N° 03: Reactivos necesarios para los procedimientos de post PCR

Cant idad De Mue stras	Volúmenes de Alícuotas Requeridas a Temperatura Ambiente				Almacenar a 4°C
	Buffer de Desnatura lización (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

- Programe el termociclador por un tiempo indefinido a una temperatura de 60°C. Durante la incubación, recuerde de cubrir la placa con sello de PCR, utilice una almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa.
- 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.
- Combine la cantidad apropiada Mezcla de Perlas (BM) con la cantidad especificada de Buffer de Hibridación (HB) para preparar la Mezcla de perlas y buffer de Hibridación (HBM) – Esto se hace inmediatamente siguiendo la neutralización de las muestras.
- 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 el diagrama abajo– No mezclar hasta la tercera centrifugación. La Reserva de SAPE (SS) está a 100X.

Tabla N° 04: Reactivos necesarios para la preparación del SAPE IX

Cantidad de pruebas	SAPE (100X)	Buffer SAPE(μl)
1	4	13.8
5	20	69
10	40	138
20	80	276
50	200	690
100	400	1380

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

6. Coloque una placa de 96 pocillos limpia en un soporte.
7. Transfiere 5 µl 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.
8. Adicionar 2.5 µl de Buffer de Desnaturalización (DB), mezclar repetidamente con la micropipeta y luego por vortex. Note que el color del amplificado se vuelva más intenso.
9. Incube por 10 minutos a temperatura ambiente.
10. Adicionar 5 µl de Buffer de Neutralización (NB), mezcle repetidamente con la micropipeta y luego por vortex. – note el cambio de color a un amarillo pálido.
11. Coloque la placa de producto de neutralización en una gradilla térmica congelada – evite la contaminación del producto PCR con agua.
12. Combine volúmenes apropiados de Mezcla de Perlas (BM) y Buffer de Hibridación (HB) - mezclar por vortex. Consultar Tabla N°03: Reactivos necesarios para los procedimientos Post – PCR.
13. Adicionar 38 µl de mezcla del buffer de hibridación y perlas a cada pocillo.
14. Quite la placa de la gradilla térmica, cúbrala con el film para sellarla, y mezcle por vortex.
15. Quite la placa del soporte y colóquela en el termociclador (60°C) pre calentado, utilice una almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa, incubar por 15 minutos.
16. Coloque la placa en el soporte, quite el film y rápidamente añada 100 µl de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, cubra nuevamente con el film y mezcle por vortex.
17. Centrifugue la placa por 5 minutos a 1300 g (1ER LAVADO).
18. Elimine el sobrenadante haciendo un flicking.
19. Coloque la placa en el soporte, quite el film y rápidamente añada 100 µl de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, cubra nuevamente con el film y mezcle por vortex.
20. Centrifugue la placa por 5 minutos a 1300 g (2DO LAVADO).
21. Elimine el sobrenadante haciendo un flicking.
22. Coloque la placa en el soporte, quite el film y rápidamente añada 100 µl de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, cubra nuevamente con el film y mezcle por vortex.
23. Centrifugue la placa por 5 minutos a 1300 g (3ER LAVADO).
24. Elimine el sobrenadante haciendo un flicking.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

25. Preparar la Solución SAPE 1X durante la tercera centrifugación. Consultar Tabla N°04: Reactivos necesarios para preparación del SAPE 1X.
26. Coloque la placa en el soporte; añadir 50 µl de la Solución SAPE 1X preparada a cada pocillo, cubra con un film y mezcle por vortex.
27. 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.
28. Saque la placa, y colóquela en el soporte, quite el film de la placa, y rápidamente añada 100 µl de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa.
29. Centrifugar la placa por 5 minutos a 1300 g.
30. Elimine el sobrenadante haciendo un flicking y el exceso de líquido secar suavemente sobre un papel absorbente.
31. Adicionar 70 µl del Buffer de Lavada (WB) a cada pocillo, mezcle con cuidado.
32. 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 µl.
33. Colocar la placa en el LABScan3D™ (previamente calibrado) para su lectura.
34. Si no se va a realizar la lectura inmediatamente mantenga la placa en oscuridad y a una temperatura de 4°C hasta su lectura.

Calibración y Programación del LABScan3D™ usando el Software Luminex

Xponent

El sistema Luminex LABScan3D™ está diseñado para una amplia gama de aplicaciones de pruebas de laboratorio que miden reacciones biomoleculares en la superficie de microesferas XMAP. Este sistema está diseñado para uso de diagnóstico in-vitro.

a.4.1. Calibración

El proceso de calibración debe realizarse periódicamente cada vez que se requiera o cuando la temperatura de trabajo sea superior a la temperatura de calibración.

1. Atemperar el kit de calibración y el de verificación de performance durante 10 a 15 minutos; estos kits contienen lo siguiente:
 - Classification Calibrator (Tapa Roja)
 - Reporter Calibrator (Tapa Verde)

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 22 de 34
------------------	--------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

- E Classification Calibrator (Tapa Azul)
 - EDR Calibrator (Tapa morada)
 - Classification Verifier (Tapa Naranja)
 - E Classification Verifier (Tapa Rosada)
 - Reporter Verifier (Tapa Amarilla)
 - Microspheres Fluidics 1 (Tapa Gris)
 - Microspheres Fluidics 2 (Tapa Negro)
2. Homogeneizar por vortex cada uno de los viales y cargar 5 gotas de cada uno en los pocillos correspondientes en la placa a utilizar.
 3. En el software LUMINEX XPONENT:
 - Hacer Click en la pestaña “Maintenance” y luego seleccionar la opción “Calibration/Verification”, aparecerá un recuadro hacia la derecha que nos indica por colores donde agregar el reactivo.
 - Hacer un Click en el círculo EJECT para abrir una compuerta del equipo y así colocar las tiras de pocillos donde se dispensaron los reactivos, hacer un click nuevamente para cerrarla.
 - Para iniciar el proceso, hacer un click en RUN.

a.4.2. Programación del LABScan3D™

El proceso de adquisición debe realizarse previamente cada vez que se ejecute un procedimiento de tipaje desde el software LUMINEX XPONENT

1. Click en la pestaña “Maintenance” y luego seleccionar la opción “Fluidics Prepare”
 - Hacer un Click en el círculo EJECT para abrir una compuerta del equipo y así colocar donde corresponda agua destilada y alcohol al 70%, hacer un click nuevamente para cerrarla.
 - Para iniciar el proceso, hacer un click en RUN.
 - Los procesos de Warmup, Prime, Alcohol Flush y Wash, se ejecutan de forma automatizada.
2. Click en la pestaña “Batches” y luego seleccionar la opción “Create a new batch from an existing protocol”
 - Colocar el nombre del nuevo batch a crear según el siguiente formato: HLA_LOCUS_ FECHA_LOTE. Por ejemplo: HLA_A-LTE4 para el batch del locus A.
 - Seleccionar el protocolo correspondiente al lote de reactivo usado para cada locus. Por ejemplo, seleccionar el protocolo RSSOW1A_004 para el locus A.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

- Luego de esto, aparecerá una nueva pantalla en donde se colocará el nombre o código de las muestras que se van a tipar, de la misma forma se podrá ajustar la distribución de las muestras y la dirección de lectura que hará el LABScan3D™. Guardar el bach al terminar este paso y seguir con el siguiente locus.

Obs.: Si se cambia de lote de reactivos deben actualizarse los protocolos desde la web de ONE LAMBDA.

3. Click en la pestaña “Batches” y luego seleccionar la opción “Create a new multibach”
 - Se va agregando a la plantilla los bach creados cuando se van a tipar varios locus a la vez (A, B, C, DRB1, DQB1), a este nivel es posible modificar la posición del bach creado.
 - Colocar el nombre correspondiente a la sesión en MULTIBACH NAME usando el siguiente formato: HLA TYPING dia/mes/año.
 - Para iniciar el proceso, hacer un click en RUN
4. El proceso de lavado debe realizarse al termino del procedimiento de tipaje desde el software LUMINEX XPONENT, Click en la pestaña “Maintenance” y luego seleccionar la opción “System Shutdown”
 - Hacer un Click en el círculo EJECT para abrir una compuerta del equipo y así colocar donde corresponda agua destilada e hipoclorito de sodio al 10%, hacer un click nuevamente para cerrarla.
 - Para iniciar el proceso, hacer un click en RUN.
 - Los procesos de Sanitize, Wash y Soak, se ejecutan de forma automatizada.
5. Apagar el sistema en el siguiente orden: Ordenador y LABScan3D™.
6. Desajustar los tapones de los bidones de fluido y eliminar el contenido del bidón de desechos.

a.4. Análisis de datos mediante el software HLA Fusion 4.2

El programa HLA Fusión 4.2 es un software para uso Diagnóstico In Vitro que permite la obtención del tipaje molecular de los genes HLA mediante la adquisición de datos obtenidos en un Analizador de Flujo LABScan3D™

1. Abrir el programa HLA Fusión 4.2 y dar click en la opción Labtype (SSO), representado por una molécula de ADN.
2. Importar datos: Hacer CLICK en la carpeta que se encuentra en el cuadro derecho de la pantalla y elegir la sesión deseada desde la carpeta XPONENT

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 24 de 34
------------------	--------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

OUTPUT. Cambiar el nombre de la sesión, elegir fecha y catálogo correcto, y cargar la tabla con las muestras.

3. En la pestaña Summary aparecen dos recuadros: en el superior se observa simbólicamente si se han asignado alelos para las muestras analizadas: rojo (asignado), rosa (no asignado por posible falso negativo), y gris (no asignado). Y en el inferior se muestra una tabla con los posibles alelos y las intensidades de fluorescencia de los controles positivos para cada muestra.
4. En la pestaña Control Value se observan tres graficas:
 - Positive Control Summary: se analiza la intensidad de fluorescencia para los controles positivos (un punto amarillo y 2 rosas correspondientes a los exones 2,3,4,5 para clase I, locus A). Los valores de fluorescencia deben ser como mínimo 500, considerando el valor ideal mayor a 1000.
 - Negative Control Summary: se analiza la intensidad de fluorescencia para el control negativo (puntos turquesa). Los valores de fluorescencia no deben superar las 500 unidades de fluorescencia.
 - Bead Count Summary: se analiza la cantidad de perlas adquiridas. El valor ideal es de 100, aunque con perlas superiores a 30 se puede llevar a cabo el análisis.
5. En pestaña Bead analysis: se observan tres recuadros:
 - One Lambda QC: corresponde a los controles de calidad para cada alelo proporcionados por el fabricante.
 - Muestras: se observan las intensidades de fluorescencia de todas las muestras adquiridas para cada perla.
 - False Reaction Summary: muestra las posibles perla implicadas en reacciones dudosas (verde: falso negativo; marrón: falso positivo)
Obs: en esta primera parte se realiza un análisis global confirmando si se han asignado matches a todas las muestras. En el caso de las perlas dudosas se ajusta el cutoff, considerando primero su proximidad al punto de corte y segundo su comparación con los controles de calidad de One Lambda.
6. Proceder al análisis individual de cada muestra. Para ello seleccionarl as una a una en la pestaña Summary. La pantalla se divide en cuatro zonas:
 - a. En la parte superior izquierda se observan cinco pestañas:
 - QC: Aparecen en gráficos los controles de calidad del fabricante.
 - Rxn: Aparece una tabla con las reacciones positivas dadas para cada perla y los posibles alelos.
 - Rec Site: Esquema de los sitios de reconocimiento de las sondas.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

- Local QC: Aparece un gráfico con las intensidades de fluorescencia de cada perla en relación a las muestras trabajadas.
 - Patient/Sample Results: Aparece una tabla resumen del paciente seleccionado, mostrando los alelos asignados para todos los locus en evaluación.
- b. En la parte superior derecha aparecen tres pestañas:
- Bead: Intensidades de fluorescencia de cada perla.
 - Raw: Tabla donde se pueden ordenar las perlas de acuerdo a la positividad (8) o negatividad (1) con sus respectivos valores de intensidad de fluorescencia (raw). A su vez permite identificar el punto de corte de las reacciones.
 - Bead info: se presenta información sobre las sondas de reconocimiento asociadas a cada perla
- c. En la parte inferior izquierda se representan las intensidades de fluorescencia de los controles, en morado los positivos y en turquesa los negativos. Igualmente se observan las intensidades de fluorescencia de cada perla, en rojo las positivas y azul las negativas.
- d. En la parte inferior derecha se muestra el listado de alelos ordenados por frecuencia y las reacciones cruzadas entre perlas (necesario revisarlas individualmente y modificar el cut-off si fuese necesario)

Obs.: en esta parte se realiza un análisis individual de cada muestra prestando atención a la intensidad de fluorescencia de cada esfera. Para ajustar el punto de corte y poder positivizar o negativizar una determinada perla se toman en cuenta los controles de calidad del fabricante, así como la de los controles internos. Una vez asignado un alelo se asigna y se guarda el análisis.

7. Adquisición del reporte: Hacer click en Reports, elegir el formato deseado, seleccionar las muestras requeridas y pinchar en View report.

Obs. Cambiar la extensión del informe a .doc o .xls o .pdf.

a.5. Reporte y Emisión de Resultados

El reporte de resultados será elaborado cuando los parámetros de calidad de la prueba hayan sido cumplidos y su emisión deberá ser realizada con la correspondiente valoración clínica patológica.

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 26 de 34
------------------	--------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

1. Elaboración del Reporte de Resultados según Modelo del Laboratorio. Ver Anexo N°04: Reporte de Resultados.
2. Validación de resultados y correlación clínico-patológica

b. Indicaciones

1. Indicaciones Absolutas

Pacientes y potenciales donantes en lista de espera para trasplante de progenitores hematopoyéticos o de órganos sólidos referidos por la Unidad de Donación y Trasplante y la Unidad de Atención Integral Especializada del INSN-SB.

2. Indicaciones Relativas

Es necesario que el paciente no haya recibido transfusiones sanguíneas 10 días previos a la toma de muestra.

Según criterio médico se puede ampliar el estudio a otros familiares consanguíneos en búsqueda de potenciales donantes haploidenticos.

El tipaje de los potenciales donantes no emparentados (cadavéricos) solo se hará bajo consentimiento de sus familiares siguiendo el protocolo de la Unidad de Donación y Trasplante y el equipo de Procura del INSN-B.

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

- Las muestras deben contener aproximadamente 2.0 ml de sangre periférica.
- La extracción de ADN a partir de bulbo piloso se realizará en pacientes politransfundidos cuyo periodo entre cada transfusión sea menor a los 10 días recomendados.
- En pacientes politransfundidos con quimioterapia se debe tomar más de 40 cabellos por paciente.
- En caso la concentración de ADN obtenida a partir de bulbo piloso no cumpla con los criterios de calidad requeridos se recomienda tomar muestra a partir de epitelio bucal.



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

IX. Autores, fecha y lugar

Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja
Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular-Servicio de Patología Clínica.
Sub Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Fecha de Elaboración: Mayo 2019
Vigencia: 02 años

Autores:

- | | |
|---|-------------------------|
| 1. Blga. Madeley Aliaga Zamudio, MsC(C) | maliaga@insnsb.gob.pe |
| 2. Dra. Carla Méndez Chacón Rodríguez | cmendez@insnsb.gob.pe |
| 3. Blgo. Luis Eduardo Grados Molina | lgrados@insnsb.gob.pe |
| 4. Blgo. Luis Martín Cruz Diaz, MsC (C) | lcruz@insnsb.gob.pe |
| 5. Dra. Andrea de María Zavaleta González | azavaleta@insnsb.gob.pe |

X. Bibliografía

1. Kotowski, M. et al. (2018). The importance of New Generation Sequencing (NGS) HLA Typing in Renal Transplantation-Preliminary Report. Transplantation Proceedings. 50(6): 165-1615.
2. Shankarkumar, U. (2004). The Human Leukocyte Antigen (HLA) System. Int J Hum Genet.4(2): 91-103.
3. Mehra,N. & Kaur, G.(2016) Histocompatiblity Antigen Complex of Man. eLS, 1-8.
4. Bensinger, W. et al. (2001) Transplantation of Bone Marrow as Compared with Peripheral blood Cells from HLA-Identical Relatives in Patients with Hematologic Cancers. N Engl J Med. 344(3): 175-181.
5. PureLink Genomic DNA Kits. For purification of genomic DNA. Product insert. Invitrogen
6. LABType CWD Typing Tests. Product insert. One Lambda, INC.

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 28 de 34
------------------	--------------------------------------	-----------------



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

XI. Anexos

Anexo N° 01: Declaración de Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA ESTUDIOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y BIOLOGÍA 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

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 29 de 34
------------------	--------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

- 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.
- 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.



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

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° _____, con 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 BIOLOGIA 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.

<p>_____</p> <p>Firma del Representante Legal</p> <p>Nombre _____</p> <p>DNI N° _____</p>	<div style="border: 1px solid black; width: 80px; height: 80px; margin: 0 auto;"></div> <p>Huella Digital</p>	<p style="text-align: right;">San Borja, dedel 20</p> <p>_____</p> <p>Firma del Médico Responsable</p> <p>CMP N° _____</p> <p>RNE N° _____</p>
--	---	---

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 BIOLOGIA MOLECULAR y asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida de mi representado.

<p>_____</p> <p>Firma del Representante Legal</p> <p>Nombre _____</p> <p>DNI N° _____</p>	<div style="border: 1px solid black; width: 80px; height: 80px; margin: 0 auto;"></div> <p>Huella Digital</p>	<p style="text-align: right;">San Borja, dedel 20</p> <p>_____</p> <p>Firma del Médico Responsable</p> <p>CMP N° _____</p> <p>RNE N° _____</p>
--	---	---

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 31 de 34
------------------	--------------------------------------	-----------------



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

Anexo N° 02: Ficha Epidemiológica del Receptor

RECEPTOR

Datos Personales		Fecha:	
Nombres y Apellidos:		N° de Historia Clínica:	
Edad:		Fecha de Nacimiento:	
Género:		Dirección	
Grupo Sanguíneo:		Estado Civil:	
N° de Hermanos		Teléfono (movil/fijo):	
N° de Hijos		Vacunas Recibidas:	

Datos Clínicos	
Motivo de Referencia	Médico Tratante:
Diagnóstico (Detalle)	Casos Familiares
Tiempo de Enfermedad	Enfermedades cursadas:
Tiempo de Tratamiento:	Intervenciones Quirúrgicas
Último Esquema de Tratamiento:	Factores de Riesgo:
Última Transfusión (Indique el Tipo)	

Otros Datos	
Nombre del padre:	
Nombre de la madre:	



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

Anexo N° 03: Ficha Epidemiológica del Donante

DONANTE

Datos Personales		Fecha:	
Nombres y Apellidos:		N° de Historia Clínica:	
Edad:		Fecha de Nacimiento:	
Género:		Dirección	
Grupo Sanguíneo:		Estado Civil:	
N° de Hermanos		Teléfono (movil/fijo):	
N° de Hijos		Vacunas Recibidas:	

Datos Clínicos	
Motivo de Referencia	Médico Tratante:
Grado de Parentesco:	Intervenciones Quirúrgicas:
Enfermedades cursadas:	Medicamentos Ingeridos:
Factores de Riesgo (transfusiones, abortos, tatuajes, etc.):	

Otros Datos



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I (LOCUS A,B,C) Y CLASE II (LOCUS DRB1 Y DQB1) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SECUENCIA ESPECÍFICA (PCR-SSO)

Anexo N° 04: Reporte del Resultado

DATOS DEL PACIENTE

NOMBRE	:	SERVICIO	:
EDAD	:	HISTORIA CLINICA	:
DIAGNOSTICO	:	SIS	:
MEDICO SOLICITANTE	:	FECHA DE TOMA DE MUESTRA	:
MEDICO RESPONSABLE	:	ANALISTA RESPONSABLE	:

DATOS TÉCNICOS DE ESTUDIO

METODOLOGÍA	:	PCR e Hibridación con Sondas de Oligonucleótidos de Secuencia Específica (SSO)
SISTEMA	:	LABType CWDTyping
TIPO DE MUESTRA	:	

ESTUDIO FAMILIAR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

NOMBRE	LOCUS A	LOCUS B	LOCUS C	LOCUS DRβ1	LOCUS DQ	
PACIENTE	A* A*	B* B*	C* C*	DRB1* DRB1*	DQA1* DQA1*	DQB1* DQB1*
POSIBLE DONANTE	A* A*	B* B*	C* C*	DRB1* DRB1*	DQA1* DQA1*	DQB1* DQB1*

*Se adjunta estudio biomolecular

COMENTARIO:

-
-

Atentamente,

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-046/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 34 de 34
------------------	--------------------------------------	-----------------