



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD:

- **TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO**
 - **DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II**
 - **CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO**

**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: Equipo Técnico del Área de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Servicio de Patología Clínica	Revisado por: <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 	Aprobado por: Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director(e) del Instituto a Nacional de Salud del Niño San Borja
---	---	--

Fecha: Febrero 2020	Código: M-010/INSN-SB/USDXT-PC-V.02	Página 1 de 23
----------------------------	--	-----------------------



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD:

- TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO
- DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II
- CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

Contenido

I. OBJETIVOS	3
II. ALCANCE.....	3
III. CONSIDERACIONES	3
IV. BASE LEGAL	5
V. CARACTERIZACION DE LOS PROCESOS.....	5
VI. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	6
VII. AUTORES. FECHA Y LUGAR	13
VIII. ANEXOS	14



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE

I. OBJETIVOS

Establecer los criterios para el control de calidad en cada una de las etapas Pre-analíticas, analíticas y post-analíticas de los procedimientos de histocompatibilidad: Tipificación molecular de los genes HLA por PCR-SSO, determinación del Porcentaje de Anticuerpos Anti HLA Reactantes contra Panel (%PRA) e identificación de especificidades Anti-HLA Clase I y Clase II y Crossmatch por Citometria de Flujo, que garanticen su correcto desarrollo con la consecuente emisión de resultados confiables en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Servicio de Patología Clínica del INSN San Borja.

II. ALCANCE

Para el personal responsable de cada una de las fases Pre-analíticas, analíticas y post-analíticas de los procedimientos de Tipificación molecular de los genes HLA por PCR-SSO, determinación del Porcentaje de Anticuerpos Anti HLA Reactantes contra Panel (%PRA) e identificación de especificidades Anti-HLA Clase I y Clase II y Crossmatch por Citometria de Flujo que se realizan en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Servicio de Patología Clínica del INSN San Borja.

III. CONSIDERACIONES

III.1 Definiciones:

CALIDAD: Se define como calidad integral o sistemas de gestión de calidad a todas las actividades y funciones encaminadas a conseguir la calidad. Cada paso de los procesos debe ser controlado para minimizar la probabilidad de que los resultados no cumplan con las especificaciones establecidas.

El sistema abarca todas las consideraciones legales (Legislación sobre Trasplante de Órganos y Tejidos y el Reglamento respectivo) y de los acuerdos consensuados de cada Equipo Trasplantador de nuestro Instituto y de los diferentes Hospitales del MINSA que sean nuestros usuarios.

El objetivo de la aplicación de los sistemas de calidad en Histocompatibilidad está dirigido a una serie de puntos críticos, áreas o fases que influyen en la confiabilidad final de los resultados.

ANTIGENOS LEUCOCITARIOS HUMANOS (HLA): Son moléculas que se encuentran en los glóbulos blancos o leucocitos de la sangre y en la superficie de casi todas las células de los tejidos de un individuo. Cumple con la función de reconocer lo propio y lo ajeno y asegura la respuesta inmune, capaz de defender al organismo de algunos agentes extraños que generan infecciones.



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

TIPIFICACION MOLECULAR HLA: Estudio mediante el cual se determina cuáles de todas las variantes conocidas del locus HLA Clase I y Clase II están presentes en un individuo determinado. El método molecular más utilizado es la amplificación específica del locus HLA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con la subsiguiente hibridación del producto amplificado por medio de Sondas de Oligonucleótidos de Secuencia Específica (SSO).

PORCENTAJE DE ANTICUERPOS REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA):

La determinación del Porcentaje de Anticuerpos Reactantes contra Panel (PRA), Anti-HLA Clase I y Clase II presentes en el suero del paciente "Receptor" constituye una de las pruebas importantes Pre-trasplante ya que los anticuerpos preformados anti-HLA, predisponen a rechazo hiperagudo y constituyen un problema sustancial en el trasplante renal.

CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO:

Las células del donante son enfrentadas al suero del receptor donde se encuentran las inmunoglobulinas específicas para los antígenos Anti-HLA del donante (DSA). Los linfocitos T y B que han sido reconocidos por los anticuerpos del receptor son luego identificados mediante los Anticuerpos monoclonales Anti-CD3 y Anti-CD19 que posteriormente serán analizados en el citometro de flujo.

Los anticuerpos anti HLA específicos contra Donante (DSA) son identificados mediante una Inmunoglobulina anti Ig-G humana marcada con Isotiocianato de fluoresceína (FITC).

III.1 Requisitos:

Para el control de la calidad del procedimiento de Tipificación molecular HLA se requiere los siguientes materiales:

- Registro de Calibración Luminex
- Registro de Mantenimiento Básico del Luminex
- Registro de control de Temperatura de Congeladora vertical de -70°C.
- Registro de control de Temperatura de Congeladora (vertical) de -20°C.
- Registro de Control de Temperatura de Refrigeradora de 2 – 8 °C
- Registro de Ingreso de reactivos. (Cardex)
- Registro de toma de muestra
- Registro de Medición de concentración y pureza de ADN
- Programa de mantenimientos de equipos.



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE

IV. BASE LEGAL

- Ley N° 26842, "Ley General de Salud"
- Ley N° 28189 "Ley General de Donación y Trasplante de órganos y/o Tejidos Humanos.
- Ley N° 29471, "Ley que promueve la Obtención, la donación y Trasplante de Órganos o Tejidos Humanos".
- Ley N° 29414, "Ley que establece los Derechos de las Personas Usuarias de los Servicios de Salud"
- Ley N° 29344, "Ley Marco de Aseguramiento Universal en Salud.
- Decreto Supremo N° 009-2012-SA "Declaran de interés nacional la Atención Integral del cáncer y Mejoramiento del Acceso a los Servicios Oncológicos en el Perú y dictan otras medidas"
- R.M. N° 394-2019/MINSA: Norma Técnica de Salud N° 151-MINSA/2019/DIGDOT.V.01: "Norma Técnica de Salud para la acreditación de Establecimientos de Salud Donadores-Transplantadores".
- R.M. N° 302-2015/ MINSA: Norma Técnica de Salud N° 117-MINSA/DGSP-V.01: "Norma Técnica de Salud para la Elaboración y Uso de Guías de Práctica Clínica del Ministerio de Salud".

V. CARACTERIZACION DE LOS PROCESOS

TIPIFICACION MOLECULAR HLA: 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.

PORCENTAJE DE ANTICUERPOS REACTANTES CONTRA PANEL (PRA): 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.

CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO:

Los anticuerpos anti HLA específicos contra Donante (DSA) son identificados mediante una Inmunoglobulina anti Ig-G humana marcada con Isotiocianato de fluoresceína (FITC). La variación del Valor de CMS determina la



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

presencia de anticuerpos pre formados DSA presentes en el suero del Receptor lo cual representa una contraindicación para el trasplante.

VI. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

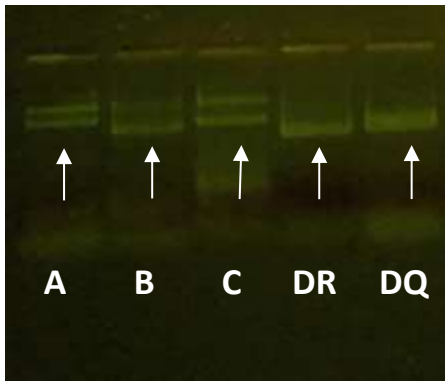
N° Paso	Descripción de Acciones	Responsable
TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES HLA POR PCR-SSO		
En la fase Pre-Analítica		
1	Realizar la entrevista a cada Paciente (Receptor) y/o tutor (según sea el caso) y consignar los datos personales y clínicos de interés en la Ficha Epidemiológica del Laboratorio.	Médico Patólogo Clínico
2	Realizar la entrevista a cada Donante consignando los datos personales y clínicos de interés en la ficha epidemiológica del laboratorio.	Médico Patólogo Clínico
3	Tomar la muestra de sangre periférica o Bulbo piloso (según sea el caso), siguiendo los procedimientos consignados en la GUIA DE PROCEDIMIENTOS PRE ANALITICOS: TOMA DE MUESTRA DE SANGRE TOTAL, BULBO PILOSO E HISOPADO BUCAL	Técnico
4	Registrar los datos completos del paciente en el Registro de toma de muestra del Laboratorio (ANEXO N°01)	Técnico
En la Fase Analítica		
5	Verificar que los <i>Registros de temperaturas de los congeladores de -70°C y -20 °C</i> estén actualizados; así como del refrigerador de 2-8 °C. (ANEXO N°02).	Biólogo
6	Verificar el cumplimiento de los mantenimientos preventivos de los equipos a utilizar según el del Programa anual de mantenimiento de equipos. (ANEXO N°03).	Biólogo
7	Verificar que los reactivos a utilizar se encuentren en las condiciones de almacenamiento adecuadas, que se hayan registrado el Lote y fecha de vencimiento del producto de acuerdo al <i>Registro de Ingreso de Reactivos</i> . (ANEXO N°04).	Biólogo
	Extracción de ADN genómico	
8	Para optimizar la cantidad y calidad de ADN extraído a partir de la muestra de sangre obtenida, verificar que la muestra tenga un recuento de leucocitos mayor a $2,0 \times 10^9/L$.	Biólogo



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE

9	Utilizar micropipetas de volumen variable de alta precisión designadas únicamente al área de PRE-PCR.	Biólogo
10	Realizar la extracción de ADN siguiendo los procedimientos consignados en la Guía de procedimiento: <i>Tipificación molecular de genes HLA Clase I (Locus A, B y C) y Clase II (Locus DRB1 y DQB1) por Reacción en Cadena de la Polimerasa e Hibridación con Sondas de Oligonucleótidos Secuencia Específica PCR-SSO.</i>	Biólogo
Cuantificación de ADN genómico.		
11	Utilizar micropipetas de volumen variable de alta precisión designadas únicamente para éste procedimiento.	Biólogo
12	Al finalizar la extracción medir la concentración y pureza del ADN extraído siguiendo los procedimientos consignados en la Guía de procedimientos: <i>Tipificación molecular de genes HLA Clase I (Locus A, B y C) y Clase II (Locus DRB1 y DQB1) por Reacción en Cadena de la Polimerasa e Hibridación con Sondas de Oligonucleótidos Secuencia Específica PCR-SSO</i>	Biólogo
13	Registrar los datos de concentración y pureza del ADN extraído en el <i>Registro de Medición de concentración y pureza de ADN</i> del Laboratorio (ANEXO N°05) y Corroborar que la muestra tenga una concentración de – 20ng/ul, y una pureza de 1.60 - 1.80, para poder realizar el proceso de amplificación.	Biólogo
Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).		
14	Utilizar micropipetas de volumen variable de alta precisión designadas únicamente al área de PCR.	Biólogo
15	Realizar las mezclas de reacción de PCR en la cabina de Flujo laminar designada para este procedimiento, UTILICE PIPETAS DESIGNADAS EXCLUSIVAMENTE PARA ESTA FASE DEL PROCEDIMIENTO.	Biólogo
16	Realizar la reacción de amplificación siguiendo los procedimientos consignados en la Guía de procedimientos: <i>Tipificación molecular de genes HLA Clase I (Locus A, B y C) y Clase II (Locus DRB1 y DQB1) por Reacción en Cadena de la Polimerasa e Hibridación con Sondas de Oligonucleótidos Secuencia Específica PCR-SSO.</i>	Biólogo

MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE

Electroforesis de los Productos de PCR		
Este procedimiento permite realizar el control de calidad del proceso de Amplificación previo.		
17	Utilizar micropipetas de volumen variable de alta precisión designadas únicamente para éste procedimiento.	Biólogo
18	Realizar el corrido electroforético en el área destinada a este proceso "área sucia".	Biólogo
19	Realizar el corrido electroforético de los productos amplificados siguiendo los procedimientos consignados en Guía de procedimientos: <i>Tipificación molecular de genes HLA Clase I (Locus A, B y C) y Clase II (Locus DRB1 y DQB1) por Reacción en Cadena de la Polimerasa e Hibridación con Sondas de Oligonucleótidos Secuencia Específica PCR-SSO.</i>	Biólogo
20	<p>Evidenciar y registrar la amplificación de los exones 2+3 para los genes de Clase I y exón 2 para los genes clase II, como se muestra en el siguiente esquema:</p> 	Biólogo
Hibridación con Sondas de Nucleótidos Secuencia Específica (SSO)		
21	Realizar el paso de Hibridación siempre y cuando se hayan evidenciado los productos de amplificación de cada locus HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1).	Biólogo
22	Realizar el proceso de Hibridación en el área de Post-PCR.	Biólogo
23	Utilizar micropipetas de volumen variable de alta precisión designadas únicamente al área de Post-PCR.	Biólogo
24	Realizar la Hibridación SSO siguiendo la Guía de procedimientos:	Biólogo



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

	<i>Tipificación molecular de genes HLA Clase I (Locus A, B y C) y Clase II (Locus DRB1 y DQB1) por Reacción en Cadena de la Polimerasa e Hibridación con Sondas de Oligonucleótidos Secuencia Específica PCR-SSO.</i>	
Lectura de los productos en el Equipo Luminex LABScam 200		
25	Realizar los procedimientos de Lavado del equipo Luminex LABScam antes de cada proceso y anotarlo en el Registro de Mantenimiento Básico del equipo. (VER ANEXO N° 06)	Biólogo
26	Realizar la calibración del instrumento y anotarlo en el <i>Registro de Calibración del Equipo</i> (VER ANEXO N°07).	Biólogo
27	Realizar la Programación y Lectura de las muestras siguiendo la Guía de procedimientos: <i>Tipificación molecular de genes HLA Clase I (Locus A, B y C) y Clase II (Locus DRB1 y DQB1) por Reacción en Cadena de la Polimerasa e Hibridación con Sondas de Oligonucleótidos Secuencia Específica PCR-SSO.</i>	Biólogo
Análisis de datos mediante el Software HLA Fusión		
28	Verificar que las Intensidades de Fluorescencia de los controles positivos para Clase I y II sean mayor de 1000 IFM.	Biólogo
29	Verificar que las Intensidades de Fluorescencia del control negativo para Clase I y II sea inferior a 500 IFM.	Biólogo
30	Verificar que la cantidad de perlas adquiridas sean 100 unidades.	Biólogo
31	El tipaje obtenido será corroborado por un segundo biólogo y supervisado por el médico patólogo clínico, cualquier divergencia será anotada en la hoja de lectura, consignando ambos su firma y fecha.	Biólogo / Médico Patólogo Clínico
En la Fase Pos Analítica		
32	Elaboración del informe de resultado y validación por el Médico Patólogo Clínico responsable del Laboratorio o médico Patólogo Clínico Asistente	Médico Patólogo Clínico
33	El archivo de los resultados, hojas de lectura, registros, cuadernos de resultados, serán guardados por 3 años como mínimo.	Biólogo/Técnico



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE

FLUJO		
34	Control de Calidad Interno La muestra de control interno será proporcionada por el jefe del Laboratorio y se realizara cada seis meses.	Biólogo/ Médico Patólogo Clínico
35	Control de Calidad Externo Se realizará con un centro de Referencia internacional en pruebas de histocompatibilidad.	Biólogo Médico Patólogo Clínico
DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACION DE ESPECIFICIDADES ANTI HLA CLASE I Y CLASE II		
En la fase Pre-Analítica		
36	Realizar la entrevista a cada Paciente (Receptor) y/o tutor (según sea el caso) y consignar los datos personales y clínicos de interés en la Ficha Epidemiológica del Laboratorio.	Médico Patólogo Clínico
37	Realizar la entrevista a cada Donante consignando los datos personales y clínicos de interés en la ficha epidemiológica del laboratorio.	Médico Patólogo Clínico
38	Tomar la muestra de sangre periférica siguiendo los procedimientos consignados en la GUIA DE PROCEDIMIENTOS PRE ANALITICOS: TOMA DE MUESTRA DE SANGRE TOTAL, BULBO PILOSO E HISOPADO BUCAL	Técnico
39	Registrar los datos completos del paciente en el Registro de toma de muestra del Laboratorio (ANEXO N°01)	Técnico
Fase analítica		
40	Verificar que los <i>Registros de temperaturas de los congeladores de -70°C y -20 °C</i> estén actualizados; así como del refrigerador de 2-8 °C. (ANEXO N°02).	
41	Verificar el cumplimiento de los mantenimientos preventivos de los equipos a utilizar según el del Programa anual de mantenimiento de equipos. (ANEXO N°03).	
42	Verificar que los reactivos a utilizar se encuentren en las condiciones de almacenamiento adecuadas, que se hayan registrado el Lote y fecha de vencimiento del producto de acuerdo al <i>Registro de Ingreso de Reactivos</i> . (ANEXO N°04).	
Pre - tratamiento de los sueros		



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

43	Los sueros deben ser tratados previamente con ultra centrifugación y pre-tratamiento con EDTA antes de su procesamiento para minimizar el <i>background</i> de los sueros.	
Hibridación y Adquisición		
44	Verificar siempre que el lote de los catálogos usados en la adquisición correspondan a los lotes de los reactivos usados.	
Análisis de datos		
45	Verificar que el Control Negativo de cada reacción tenga una lectura de fluorescencia baja, menor a 1000 MFI.	
46	Verificar que las Intensidades de Fluorescencia de los controles positivos para Clase I y II sean mayor de 1000 IFM.	
47	Verificar que la cantidad de perlas adquiridas sean 100 unidades como mínimo.	
48	El análisis y reporte de resultados debe realizarse solo si se han cumplido los criterios de calidad anteriores.	
En la fase Pos-Analítica		
49	Elaboración del informe de resultado y validación por el Médico Patólogo Clínico responsable del Laboratorio o médico Patólogo Clínico Asistente	Médico Patólogo Clínico
50	El archivo de los resultados, hojas de lectura, registros, cuadernos de resultados, serán guardados por 3 años como mínimo.	Biólogo/Técnico
51	Control de Calidad Interno La muestra de control interno será proporcionada por el jefe del Laboratorio y se realizara cada seis meses.	Biólogo/ Médico Patólogo Clínico
52	Control de Calidad Externo Se realizará con un centro de Referencia internacional en pruebas de histocompatibilidad.	Biólogo Médico Patólogo Clínico
CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO		
En la fase Pre-Analítica		
53	Realizar la entrevista a cada Paciente (Receptor) y/o tutor (según sea el caso) y consignar los datos personales y clínicos de interés	Médico Patólogo Clínico



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

	en la Ficha Epidemiológica del Laboratorio.	
54	Realizar la entrevista a cada Donante consignando los datos personales y clínicos de interés en la ficha epidemiológica del laboratorio.	Médico Patólogo Clínico
55	Tomar la muestra de sangre periférica, siguiendo los procedimientos consignados en la GUIA DE PROCEDIMIENTOS PRE ANALITICOS: TOMA DE MUESTRA DE SANGRE TOTAL, BULBO PILOSO E HISOPADO BUCAL	Técnico
56	Registrar los datos completos del paciente en el Registro de toma de muestra del Laboratorio (ANEXO N°01)	Técnico
En la fase Analítica		
57	Verificar que los <i>Registros de temperaturas de los congeladores de -70°C y -20 °C</i> estén actualizados; así como del refrigerador de 2-8 °C. (ANEXO N°02).	Biólogo
58	Verificar el cumplimiento de los mantenimientos preventivos de los equipos a utilizar según el del Programa anual de mantenimiento de equipos. (ANEXO N°03).	Biólogo
59	Verificar que los reactivos a utilizar se encuentren en las condiciones de almacenamiento adecuadas, que se hayan registrado el Lote y fecha de vencimiento del producto de acuerdo al <i>Registro de Ingreso de Reactivos</i> . (ANEXO N°04).	Biólogo
	<i>Obtención de Mononucleares</i>	
60	Seguir cada uno de los pasos consignados en la Guía de Procedimientos. Crossmatch por Citometría de Flujo, para mantener la mayor viabilidad Celular.	Biólogo
61	La concentración final de leucocitos que se requiere es de 500 000 células por tubo de reacción.	Biólogo
	<i>Marcación</i>	
62	El suero utilizado del receptor no debe tener una antigüedad mayor a 3 meses.	Biólogo
63	Los anticuerpos monoclonales deben estar vigentes	Biólogo
	<i>Adquisición de datos en el citómetro de Flujo</i>	
64	Antes de iniciar cualquier procedimiento se debe realizar el Test de Performance del instrumento y verificar que todos los	Biólogo



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE

	Flujo parámetros del equipo se encuentren aceptables.	
65	Configurar el citometro de Flujo para adquirir un mínimo de 5000 linfocitos B.	Biólogo
66	Analizar los resultados tomando en cuenta los puntos de cortes de la prueba establecidos en el laboratorio.	Biólogo
En la fase Pos-Analítica		
67	Elaboración del Reporte de resultado y validación por el Médico Patólogo Clínico responsable del Laboratorio o médico Patólogo Clínico Asistente	Médico Patólogo Clínico
68	El archivo de los resultados, hojas de lectura, registros, cuadernos de resultados, serán guardados por 3 años como mínimo.	Biólogo/Técnico
69	Control de Calidad Interno La muestra de control interno será proporcionada por el jefe del Laboratorio y se realizara cada seis meses.	Biólogo/ Médico Patólogo Clínico
70	Control de Calidad Externo Se realizará con un centro de Referencia internacional en pruebas de histocompatibilidad.	Biólogo Médico Patólogo Clínico

VII. AUTORES. FECHA Y LUGAR

Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular-INSN San Borja. Febrero 2020

Autores:

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

"Decenio de la Igualdad de oportunidades para mujeres y hombres"
"Año de la Universalización de la Salud"

MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

VIII. ANEXOS

ANEXO 01: Registro de Toma de Muestra

[illegible]



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

ANEXO 02: Registro de Control de Temperaturas de congeladores (-20 °C Y -70 °C)

Laboratorio HISTOCOMPATIBILIDAD Y
BIOLOGIA MOLECULAR

Área: Biología Molecular

Mes: _____

Equipo: CONGELADORA VERTICAL
DE -20°C

CÓDIGO: L-107

ESPECIFICACIONES: Temperatura -70°C

Día	Hora	Temperatura °C	OBSERVACIONES	Responsable	
				INICIALES	FIRMA
16	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
17	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
18	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
19	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
20	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
21	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
22	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
23	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
24	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
25	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

Laboratorio	HISTOCOMPATIBILIDAD Y BIOLOGIA MOLECULAR		Área: Biología Molecular	
Mes:				
Equipo:	CONGELADORA VERTICAL DE -70°C		CÓDIGO: R5A	

ESPECIFICACIONES: Temperatura -70°C					
Día	Hora	Temperatura °C	OBSERVACIONES	Responsable	
				INICIALES	FIRMA
1	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
2	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
3	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
4	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
5	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
6	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
7	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
8	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				
9	08:00:00 a.m.				
	02:00:00 p.m.				
	08:00:00 p.m.				

"Decenio de la Igualdad de oportunidades para mujeres y hombres"
"Año de la Universalización de la Salud"

MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

ANEXO 03: Programa de Mantenimiento de equipo

[illegible]

"Decenio de la Igualdad de oportunidades para mujeres y hombres"
"Año de la Universalización de la Salud"

MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE

ANEXO 04: Registro de Ingreso de Reactivos-CARDEX

[illegible]

"Decenio de la Igualdad de oportunidades para mujeres y hombres"
"Año de la Universalización de la Salud"

MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE

ANEXO 05: Registro de medición de concentración y pureza del ADN

[illegible]



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

ANEXO 06: Registro de Mantenimiento Básico del LUMINEX

LABORATORIO: Histocompatibilidad y Biología Molecular

AREA: Post-PCR

MES: _____

Mantenimiento Básico

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Lavado con alcohol																														
Lavado con solución del sistema																														
Lavado con Hipoclorito de Sodio al 10%																														
Eliminación de burbujas																														
Calibración																														
Controles																														



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

ANEXO 07: Registro de Calibración del LUMINEX

EQUIPO	LABSCAN
MODELO	200
UBICACIÓN	SECCION DE HISTOCOMPATIBILIDAD

ITEM	FECHA DE REALIZACION	LOTE	CALIBRADORES		REALIZADO POR	OBSERVACIÓN
			CAL 1	CAL 2		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

ANEXO 08: Registro de Controles del LUMINEX

EQUIPO	LABSCAN
MODELO	200
UBICACIÓN	SECCIÓN DE HISTOCOMPATIBILIDAD

ITEM	FECHA DE REALIZACIÓN	LOTE	CALIBRADORES		REALIZADO POR	OBSERVACIÓN
			CON 1	CON 2		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						



MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD: TIPIFICACION MOLECULAR DE GENES HLA CLASE I Y CLASE II POR PCR-SSO, DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ANTICUERPOS ANTI-HLA REACTANTES CONTRA PANEL (%PRA) E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA CLASE I Y CLASE II Y CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUJO

ENTRADAS			
NOMBRE	FUENTE	FRECUENCIA	TIPO
Control de calidad de los procedimientos priorizados	Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular	Según programa	Manual
SALIDAS			
NOMBRE	FUENTE	FRECUENCIA	TIPO
Informe de Calidad de adherencia a las guía	Comité de Calidad	Según programa	Manual