



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE POLIOMAVIRUS BK (BKV) POR PCR EN TIEMPO REAL

Guía de Procedimiento para Determinación de Carga Viral de Poliovirus BK (BKV) por PCR en Tiempo Real

Servicio de Patología Clínica
Sub Unidad de Apoyo al Diagnóstico



<p>Elaborado por:</p> <p>Equipo Técnico del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Servicio de Patología Clínica.</p>	<p>Revisado por:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento • Sub Unidad De Soporte Al Diagnostico • Unidad de Gestión de la Calidad 	<p>Aprobado por:</p> <p>Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director (e) del Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja</p>
--	--	---



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE POLIOMAVIRUS BK (BKV) POR PCR EN TIEMPO REAL

Guía de Procedimiento para Determinación de Carga Viral de Poliovirus BK (BKV) por PCR en Tiempo Real

- I. Título.....3
- II. Finalidad.....3
- III. Objetivos3
- IV. Ámbito de Aplicación3
- V. Nombre del proceso o Procedimiento y Código CPT3
- VI. Consideraciones Generales.....3
 - a. Definiciones Operativas.....3
 - 1 Definición del procedimiento3
 - 2 Consentimiento informado.....4
 - b. Conceptos Básicos4
 - c. Requerimientos Básicos4
- VII. Consideraciones Específicas5
 - a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento5
 - b. Indicaciones12
 - 1 Indicaciones Absolutas.....12
 - 2 Indicaciones Relativas12
 - c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes13
 - d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes13
 - e. Contraindicaciones13
- VIII. Autores, Fecha y Lugar13
- IX. Bibliografía.....13



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE POLIOMAVIRUS BK (BKV) POR PCR EN TIEMPO REAL

**Guía de Procedimiento para Determinación de Carga Viral
de Poliovirus BK (BKV) por PCR en Tiempo Real**

I. Título

Procedimiento para determinación de Carga Viral de Poliovirus BK (BKV) por PCR en Tiempo Real.

II. Finalidad

Determinar los procedimientos técnicos para la correcta determinación de la carga viral de Poliovirus BK (BKV) por PCR en tiempo real.

III. Objetivos

Realizar el procedimiento de Cuantificación de la Carga Viral de Poliovirus BK (BKV), por PCR en tiempo Real (qPCR) a partir de muestras de suero y orina.

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 y Código CPT

Determinación de Carga Viral de Poliovirus BK (BKV) por PCR en Tiempo Real.
CPMS: 8780004

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1 Definición del procedimiento

Este ensayo utiliza la amplificación por PCR en tiempo Real del ADN del Poliovirus BK (BKV). La detección se basa en la amplificación de una secuencia conservada que sobrelapa los bordes de una secuencia entre los genes que codifican para las proteínas VP1 y VP2. La cuantificación se realiza por detección de fluorescencia en el canal del FAM para cada una de las muestras biológicas y extrapolando dicho valor de fluorescencia en una curva de Calibración Estándar. Las unidades de reporte son en copias/ml.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE POLIOMAVIRUS BK (BKV) POR PCR EN TIEMPO REAL**2 Consentimiento informado**

No requiere

b. Conceptos Básicos

- **La carga viral** es la cuantificación de las partículas virales en muestras clínicas humanas (Sangre total, plasma, suero, orina, LCR, etc), utilizando técnicas de Biología Molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), amplificaciones de señal mediante Sondas, etc.
- **Poliomavirus BK (BKV)** se establece como una infección latente en más de un 80% de la población adulta, aparentemente asintomática en individuos inmunocompetentes. En los receptores de trasplante, sin embargo, la reactivación de BKV es común y puede dar lugar a patologías que varían de acuerdo al tipo de pacientes. En receptores de trasplante renal (TR), está asociado con nefropatía y estenosis uretral y en receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas (CMH) con cistitis hemorrágica.

c. Requerimientos Básicos**Recursos Humanos**

- Médico Patólogo Clínico.
- Biólogo.
- Técnico de Laboratorio.

Equipos Biomédicos

- Termociclador en Tiempo Real
- Cabina de Bioseguridad Clase II-A2
- Ultracentrifuga refrigerada
- Termobloque de calor seco
- Vórtex
- Micropipetas 1-10 µl
- Micropipeta de 2 – 20 µl
- Micropipetas 20 – 200 µl
- Micropipeta de 100 – 1000 µl
- Congeladora de - 70 °C
- Congeladora de - 20 °C
- Refrigeradora de 2 - 8 °C



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE POLIOMAVIRUS BK (BKV) POR PCR EN TIEMPO REAL

Material médico no Fungible

- 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
- Crioviales de 2.0 ml
- Gradillas para tubos de 2.0 ml
- Gradilla de tubos de 12 x 75 mm
- Criobox
- Contenedor de desechos biológicos de 1L
- Contenedor de desechos biológicos de 4L
- Placas de PCR
- Tapas de microtubos de 0.2 ml para PCR en Tiempo Real.

Material médico Fungible

- **Reactivos**
 - Kit de Extracción de ADN viral (IVD).
 - Kit de PCR en Tiempo Real para Detección y Cuantificación de Poliomasvirus BK (IVD).
- **Materiales**
 - Papel absorbente.
 - Guantes de nitrilo
 - Gafas protectoras.
- **Soluciones**
 - Etanol Absoluto

VII. Consideraciones Específicas

a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento

Procedimientos

Tiempo: 380 minutos

➤ Preparación de la Muestra (50 Minutos)

Al inicio del trabajo

- 1 Toda muestra debe ser ingresada con letra legible, especificando el tipo de prueba a realizarse en el Registro General de Toma de Muestra del Servicio de Patología Clínica.
- 2 En caso de las muestras referidas, verificar la legibilidad de los nombres tanto del paciente como del médico solicitante al momento de recepcionar la muestra.



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE POLIOMAVIRUS BK (BKV) POR PCR EN TIEMPO REAL

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

Numeración

- 1 Verificar la calidad de las muestras de sangre obtenidas, por ejemplo: hemólisis, lipemia, ictericia, etc (Describir en la orden de ser el caso).
- 2 Numerar en orden correlativo cada una de las muestras extraídas consignando los siguientes datos:
 - Tipo de Examen solicitado
 - Tipo de muestra
 - Fecha de la toma de muestra
 - Procedencia de la muestra: Sangre Periférica (Punción) o Catéter venoso central (CVC)
- 3 La numeración asignada debe estar indicada en la orden de laboratorio como en el tubo que contiene la muestra. Ejemplo:
 - BKV-SUERO/01-10-18 • BKV-ORINA/01-10-18
- 4 Reposar las muestras extraídas en posición vertical por 20 minutos a temperatura ambiente.

Transporte y Almacenamiento

- 1 Rotular en orden correlativo los tubos o crioviales necesarios que se enviarán al laboratorio según la cantidad de muestras, indicando los siguientes datos:
 - Nombre del Paciente
 - Numeración asignada según tipo de examen solicitado
 - Fecha de toma de muestra.

Ejemplo:

Pablo Ruiz Fernández
1BKV-SUERO/01-10-18



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE POLIOMAVIRUS BK (BKV) POR PCR EN TIEMPO REAL

- 2 Para obtener la muestra de suero necesaria para el estudio; centrifugar las muestras de SANGRE SIN ANTICOAGULANTE a 3000 rpm y/o 1100 g por 20 minutos, transferir el suero (sobrenadante) a un criovial de almacenamiento (tapa rosca) de 2 ml o viales de 1,5 ml, debidamente rotulado. Utilizar pipetas de transferencia estériles de 3 ml.
- 3 Las muestra de orina debe obtenerse en forma aséptica en tubo o frasco estéril, luego de un aseo prolijo con agua en la zona genital. Homogeneizar la muestra en vórtex por 10 segundos, tomar una alícuota con pipeta estéril de transferencia de 3 ml y transferir un volumen representativo en crioviales de 2 ml.
- 4 En caso de que el proceso no se realice el mismo día de toma de muestra, el almacenaje de las muestras procederá de acuerdo a parámetros de estabilidad de muestra, tal como se detalla en el siguiente cuadro:

VIRUS	Muestra	Almacenaje	Estabilidad de la Muestra
Poliomavirus BK (BKV)	Suero	Congelación (-70 °C)	> 72 horas
	Orina	Congelación (-70 °C)	> 72 horas

Al Final del trabajo

- 1 Limpiar la superficie de la mesa de trabajo utilizada.
 - 2 Dejar los materiales utilizados en su lugar respectivo.
 - 3 Eliminar los guantes y/o otros materiales descartables en los reservorios adecuados (bolsa roja).
 - 4 Lavarse las manos con jabón desinfectante disponible.
- **Extracción de ADN Viral (120 Minutos)**

Preparación de los reactivos

1. Extraer del congelador de -20°C el Control Interno de Extracción (IC) y dejar a temperatura ambiente.
2. Separar (según el número de muestras clínicas y controles a procesar) las columnas de extracción y rotularlas con el número de muestra correspondiente de acuerdo a la lista de trabajo.
3. Agregar 20 mL de Etanol absoluto a la solución removedora de inhibidores de PCR (Inhibitor Removal Buffer) y mezclar por inversión. Dejar indicado en el frasco la fecha de preparación.
4. Agregar 40 mL de Etanol absoluto a la solución de lavado 2 (Wash Buffer) y mezclar por inversión. Dejar indicado en el frasco la fecha de preparación.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL
DE POLIOMAVIRUS BK (BKV) POR PCR EN TIEMPO REAL

5. Agregar 5 mL de buffer de elución al frasco que contiene el liofilizado de Proteínasa K, mezclar hasta disolver.

Proceso de Extracción

1. Encender la Cabina de Bioseguridad asignada para la extracción de ácidos nucleicos. Ver PC-BM-I-004: INSTRUCTIVO DE MANEJO CABINA DE BIOSEGURIDAD CLASE II TIPO A2.
2. Rotular en orden ascendente el número de crioviales necesarios según la lista de trabajo del día.
3. Mezclar por vórtex vigorosamente las muestras y controles (Aproximadamente por 10 segundos).
4. Dispensar 25 μ L de Proteínasa K a cada criovial que se va a utilizar según la lista de trabajo del día.
5. Agregar 5 μ L de Control Interno de Extracción (IC) a cada criovial que se va a utilizar según la lista de trabajo del día.
6. Mezclar por vórtex vigorosamente (Aproximadamente por 10 segundos).
7. Agregar 200 μ L de las muestras y Control NTC (Buffer de elución), según corresponda.
8. Agregar 200 μ L del Binding Buffer a cada muestra.
9. Mezclar por vórtex vigorosamente (Aproximadamente por 10 segundos)
10. Incubar a 70°C por 10 minutos en un termobloque de calor seco.
11. Sacar las muestras y mezclar vigorosamente en el vórtex (Aproximadamente por 10 segundos).
12. Agregar 100 μ L de Binding Buffer a cada muestra.
13. Mezclar por vórtex vigorosamente (Aproximadamente por 10 segundos).
14. Trasvasar el contenido de cada criovial en las columnas de extracción identificadas (utilizar pipetas de transferencia de 3 mL).
15. Centrifugar a 11 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
16. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
17. Agregar 500 μ L de solución removedora de inhibidores (Inhibitor Removal Buffer) a cada columna.
18. Centrifugar a 11 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
19. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
20. Agregar a cada columna 500 μ L de buffer de lavado (Wash Buffer).
21. Centrifugar a 11000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
22. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
23. Agregar a cada columna 500 μ L de buffer de lavado (Wash Buffer).



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE POLIOMAVIRUS BK (BKV) POR PCR EN TIEMPO REAL

- 24. Centrifugar a 11000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 25. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
- 26. Centrifugar a 11 000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente para secar las columnas.
- 27. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
- 28. Agregar 50 µL de la solución del Buffer de Elución, directamente a la membrana de sílice de las columnas.
- 29. Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente.
- 30. Centrifugar a 11 000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente.
- 31. La solución eluida contiene ADN viral para el proceso de amplificación. Si no se usa el mismo día congelar a -20°C por un máximo de 24 horas.

➤ **Amplificación por PCR en Tiempo Real (180 Minutos)**

Al inicio del trabajo

- 1. Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
- 2. Encender la Cabina de Bioseguridad asignada para la preparación y cargado de las reacciones de PCR. Ver PC-BM-I-004: INSTRUCTIVO DE MANEJO CABINA DE BIOSEGURIDAD CLASE II TIPO A2.
- 3. Retirar los reactivos para la preparación de la mezcla de PCR y los controles de Amplificación del congelador de -20 °C y dejar a temperatura ambiente.
- 4. Cortar las filas necesarias de la placa de PCR con sus respectivas tapas.

Preparación de la mezcla de PCR

- 1. Dispensar 30 µL de la master Mix en cada pocillo de la placa de PCR.
- 2. Agregar 10 µL de los Estándares, Control NTC y muestras según el siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Estándar 01	Muestra 4										
B	Estándar 02	Muestra 5										
C	Estándar 03	Muestra 6										
D	Estándar 04	Muestra 7										
E	NTC	Muestra 8										
F	Muestra 1	Muestra 9										
G	Muestra 2	Muestra 10										
H	Muestra 3	Muestra 11										



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE POLIOMAVIRUS BK (BKV) POR PCR EN TIEMPO REAL

3. Eliminar las burbujas presentes en la solución.
4. Tape cada pocillo con las tapas especiales para reacciones en PCR en tiempo Real. No tocar las tapas con los dedos.
5. Coloque la placa cargada en el bloque térmico del Termociclador en tiempo Real y cierre la tapa del equipo.

Programación del equipo MX3500P System (Stratagene)

1. Ingresar al software Mx y elegir Quantitative PCR en la ventana new Options Screen.



2. Ingresar los parámetros básicos de los estándares, NTC y de las muestras:
 - a. Definir las posiciones de los estándares en la placa de PCR en el Mx.
 - b. En el menú de la derecha, seleccione e indique:
 - i. Well type: Standard
 - ii. Collect fluorescence data: FAM, ROX
 - iii. Reference dye: ROX
 - iv. Replicate symbol: none.
 - c. Definir la posición del Control NTC en la Placa de PCR en el Mx.
 - d. En el menú de la derecha, selecciones e indique:
 - i. Well type: NTC
 - ii. Collect fluorescence data: FAM, ROX, HEX
 - iii. Reference dye: ROX
 - iv. Replicate symbol: none.
 - e. Definir la posición de las muestras en la Placa de PCR en el Mx.
 - f. En el menú de la derecha, selecciones e indique:
 - i. Well type: Unknown



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE POLIOMAVIRUS BK (BKV) POR PCR EN TIEMPO REAL

- ii. Collect fluorescence data: FAM, ROX,HEX
- iii. Reference dye: ROX
- iv. Replicate symbol: none.

g. Haciendo doble click en cada pocillo, aparecerá el cuadro de diálogo de información del Pocillo. Introduzca según corresponda:

- Estándar 01
- Estándar 02
- Estándar 03
- Estándar 04
- Control NTC
- Nombre del Paciente

3. Configurar los parámetros de amplificación PCR con los siguientes datos:

✓ Segmento 01

- UDG decontamination (37°C por 2 min.) -- > 01 Ciclo

✓ Segmento 02

- Initial denaturation (95°C por 10 min.)
 - Denaturation (95°C por 5 s)
 - Annealing (60°C por 40 s)
 - reading of the fluorescence signal
 - Extensión (72°C por 20 s)
- } 45 ciclos

4. Guardar la corrida en la carpeta correspondiente y hacer click en Start para iniciar la corrida.

➤ **Análisis de datos y validación de parámetros de amplificación (30 minutos)**

1. Cuando el programa de amplificación haya culminado, hacer click en Analysis del menú de la izquierda.
2. Active la pestaña de visualización del canal FAM para verificar la amplificación de los Estándares.
3. Active la pestaña de visualización del canal HEX para verificar la amplificación del control Interno presente en todas las muestras y en el control negativo.
4. Hacer click en Amplificación plot y verifique los Ct de amplificación del Control Interno, Estándares y muestras clínicas.



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE POLIOMAVIRUS BK (BKV) POR PCR EN TIEMPO REAL

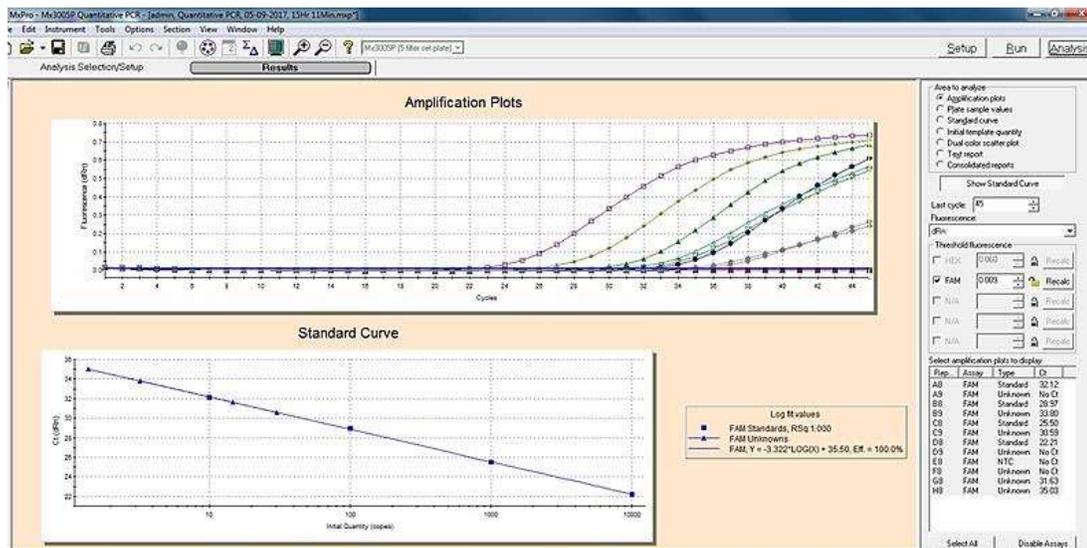
5. Hacer click en Show Standard Curve y verifique los datos de RSq y % de eficiencia, los cuales deben estar cerca de 1 y 100 %, respectivamente.
6. Para mostrar los resultados de cuantificación, hacer click en Text report.
7. Utilice la siguiente fórmula para calcular la concentración de una muestra en unidades (genoma, copias, UI) por 1 ml:

$$\text{Concentración} = \frac{cVZ \times E0}{I}$$

cVZ = concentración de la muestra en unidades/μL

E0 = Volumen de elución en μL

I = Volumen de muestra usado en mL



b. Indicaciones

1 Indicaciones Absolutas

Cuantificación de ADN viral de BKV en pacientes pediátricos remitidos por los diversos servicios del Instituto Nacional del Niño – San Borja (INSN-SB).

2 Indicaciones Relativas

- Cuantificación de ADN viral de BKV en pacientes pediátricos hospitalizados o por consulta de los diferentes servicios del INSN-SB.
- Las muestras validadas para la detección de ADN viral de BKV por PCR a Tiempo Real son: Suero y Orina.



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE CARGA VIRAL DE POLIOMAVIRUS BK (BKV) POR PCR EN TIEMPO REAL

c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes

Ninguno

d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes

Ninguno

e. Contraindicaciones

Ninguna

VIII. 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: Febrero 2020
 Vigencia: 02 años
 Autores:

- | | |
|---|-------------------------|
| 1. Blgo. Luis Eduardo Grados Molina | lgrados@insnsb.gob.pe |
| 2. Blga. Giannina Wendy Tineo Pozo, MsC (C) | gtineo@insnsb.gob.pe |
| 3. Dra. Carla Méndez Chacón Rodríguez | cmendez@insnsb.gob.pe |
| 4. Dra. Andrea de María Zavaleta González | azavaleta@insnsb.gob.pe |
| 5. Blga. Madeley Aliaga Zamudio, MsC(C) | maliaga@insnsb.gob.pe |
| 6. Blgo. Luis Martín Cruz Diaz, MsC (C) | lcruz@insnsb.gob.pe |

IX. Bibliografía

- Eash S.; Manley K., Gasparovic M., Querbes W. and Atwood W. Review: The human polyomaviruses. Cell.Mol.Life Sci. 63 (2006) 865-876.
- Narayanan S. The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. Am J Clin Pathol. 2000; 113:429 – 452.
- Protection of laboratory workers from infectious disease transmitted by blood, body fluids and tissue. Tentative Guideline. NCCLS Document M29-T Villanova, PA:NCCLS, 1989. erase chain reactions. Gene. 93(1):125-128..
- GeneProof BK Virus (BKV) PCR kit insert.