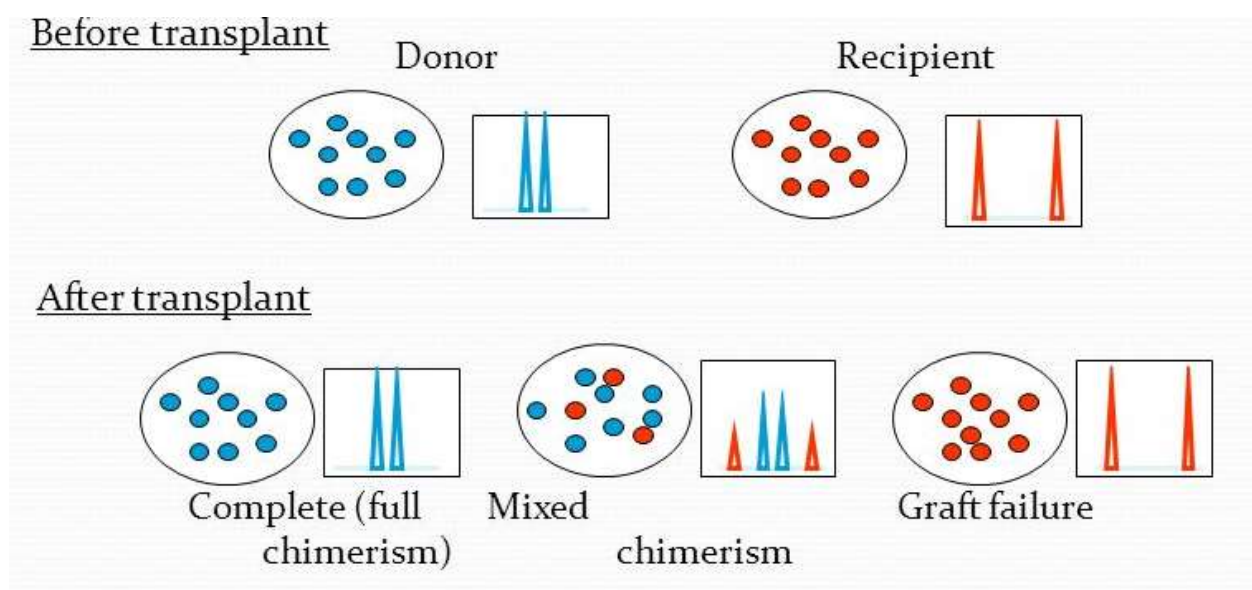


GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE SIN SELECCIÓN CELULAR

QUIMERISMO POST TRASPLANTE SIN SELECCIÓN CELULAR

SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR e HISTOCOMPATILIDAD



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

Fecha: Febrero 2020	GP-018/INSN-SB/USDXT/PC-V 0.1	Página 1 de 9
---------------------	-------------------------------	---------------



GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE SIN SELECCIÓN CELULAR

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE SIN SELECCIÓN CELULAR

I.	Título.....	3
II.	Finalidad	3
III.	Objetivos.....	3
a.	Objetivo General	3
b.	Objetivos específicos.....	3
IV.	Ámbito de aplicación	3
V.	Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPMS	3
VI.	Consideraciones Generales	3
a.	Definiciones Operativas	3
1.	Definición del Procedimiento.....	3
2.	Consentimiento Informado.....	4
b.	Conceptos Básicos	4
c.	Requerimientos Básicos	4
VII.	Consideraciones Específicas	5
a.	Descripción detallada del Proceso o Procedimiento.....	5
a.1.	Preparación de la Muestra	5
a.2.	Extracción de ADN genómico (60 minutos).....	6
a.3.	Amplificación por PCR en tiempo final (120 minutos).....	7
a.4.	Electroforesis capilar	8
a.5.	Análisis de resultados	8
b.	Indicaciones.....	8
1.	Indicaciones Absolutas	8
2.	Indicaciones Relativas.....	8
c.	Riesgos o complicaciones	8
d.	Contraindicaciones.....	8
VIII.	Limitaciones y Validez de los Resultados	8
IX.	Recomendaciones	9
X.	Autores, fecha y lugar.....	9
XI.	Anexos	9
XII.	Bibliografía.....	9



GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE SIN SELECCIÓN CELULAR

I. Título

Guía de procedimiento de Quimerismo Post Trasplante sin selección celular

II. Finalidad

La introducción de la técnica de la PCR como método rápido para multiplicar las zonas de microsatélites STR, ha proporcionado una poderosa herramienta para el estudio del quimerismo. Su principal ventaja es la gran sensibilidad, que permite detectar pequeñas poblaciones de células del donante o del receptor. Con esta técnica, es posible realizar un estudio cinético del comportamiento del injerto, e incluso encontrar evidencias de un injerto establecido antes que las evidencias morfológicas aparezcan. Una quimera establecida como completa en los primeros días después del trasplante, puede evolucionar a quimera mixta e incluso desaparecer, lo que se traduciría finalmente en un fallo del injerto. Por otra parte, el estado de quimera mixta puede evolucionar hacia el fallo del injerto, si predominan las células del receptor o hacia el estado de quimera completa con predominio casi absoluto (98 a 100 %) de la hematopoyesis del donante. Por lo tanto, dado que el estado de quimera puede variar en el tiempo, es importante monitorear su evolución.

III. Objetivos

a. Objetivo General

Establecer el porcentaje de quimerismo post trasplante en el receptor

b. Objetivos específicos

- Establecer el perfil genético en una muestra del receptor post trasplante.
- Calcular el porcentaje de quimerismo post trasplante

IV. Ámbito de aplicación

Pacientes del programa de trasplante de progenitores hematopoyéticos y sus respectivos donantes del INSNSB

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

Quimerismo Molecular Cuantitativo

CPMS : 81267

CÓDIGO POE : PC-BMOL

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

El Quimerismo Molecular Cuantitativo consta de la identificación de los alelos pertenecientes a los 24 loci, conforman el perfil genético de un individuo. El quimerismo molecular cuantitativo en la fase pos trasplante, tiene por finalidad establecer el porcentaje de perfiles genéticos (donante – receptor) en una muestra de sangre extraída del receptor.

El monitoreo se realiza según indicación del médico tratante y los periodos de tiempo son variables. Es indispensable contar con el estudio de Quimerismo Pre trasplante CPT 81265 ó los Perfiles de Identidad Humana CPT 81266.

Fecha: Febrero 2020	GP-018/INSN-SB/USDXT/PC-V 0.1	Página 3 de 9
---------------------	-------------------------------	---------------

2. Consentimiento Informado

No requiere

b. Conceptos Básicos

Una quimera establecida como completa en los primeros días después del trasplante, puede evolucionar a quimera mixta e incluso desaparecer, lo que se traduciría finalmente en un fallo del injerto. Por otra parte, el estado de quimera mixta puede evolucionar hacia el fallo del injerto, si predominan las células del receptor o hacia el estado de quimera completa con predominio casi absoluto (98 a 100 %) de la hematopoyesis del donante.⁴ Por lo tanto, dado que el estado de quimera puede variar en el tiempo, es importante monitorear su evolución.

QUIMERISMO EN TRASPLANTES CON RÉGIMENES MIELOABLATIVOS

En los trasplantes convencionales, el régimen de acondicionamiento que se aplica es tal, que produce una eliminación casi completa del tejido hematopoyético y linfóide del receptor, por lo que generalmente se alcanza un grado de quimerismo total o completo. Además, en estos casos, la alorreactividad del donante contra las células del receptor es poco significativa. Por lo tanto, la determinación del quimerismo no es esencial cuando se trata de un trasplante mieloablativo que utiliza régimen de acondicionamiento y profilaxis de la EICH convencionales.

QUIMERISMO EN LOS TRASPLANTES CON RÉGIMENES DE TOXICIDAD REDUCIDA

En los regímenes de toxicidad reducida, el acondicionamiento a que se lleva el paciente es solo el suficiente para que se logre la implantación del injerto. Se ha demostrado que bajo este régimen, se conserva el tejido hematopoyético del paciente y se alcanza un estado de quimerismo mixto que puede mantenerse estable durante años y no es necesariamente señal de recaída.

QUIMERISMO EN LOS TRASPLANTES CON RÉGIMENES NO MIELOABLATIVOS

Aún se encuentra en estudio la relación que existe entre el quimerismo que se establece cuando se aplica un régimen de acondicionamiento no mieloablativo y el estado clínico del paciente tras el trasplante.

c. Requerimientos Básicos

- Equipos Biomédicos
 - Analizador Genético de Capilares
 - Termociclador en Gradiente
 - Cabina de Bioseguridad
 - Ultracentrifuga refrigerada
 - Termoblock
 - Vortex
 - Micropipetas 1-10 ul
 - Micropipeta de 2 – 20 ul
 - Micropipetas 20 – 200 ul
 - Micropipeta de 100 – 1000 ul
 - Congeladora de - 70°C
 - Congeladora de - 20°C
 - Refrigeradora de 2 a 8°C
- Material médico no Fungible
 - Tips con filtro de 1 – 10 ul
 - Tips con filtro de 2 – 20 ul
 - Tips con filtro de 20 – 200 ul
 - Tips con filtro de 100 – 1000 ul

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE SIN SELECCIÓN CELULAR

- Tubos de 1.5 ml
 - Gradillas para tubos de 2.0 ml
 - Gradilla de tubos de 12x75 mm
 - Criobox
- Material médico Fungible
 - Reactivos
 - Kit de Extracción de ADN genómico
 - Kit de Amplificación de marcadores STR (24 marcadores)
 - Materiales
 - Guantes de nitrilo descartables
 - Lentes protectores de policarbonato
 - Soluciones
 - Etanol Absoluto
 - Formamida HiDi
- Recursos Humanos
 - Técnico de laboratorio
 - Biólogo
 - Médico Patólogo Clínico
- Contenedor de desechos biológicos de 1L
- Contenedor de desechos biológicos de 4L
- Tubos de PCR 0.2 ml

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

Tiempo: 40 minutos

a.1. Preparación de la Muestra**Al inicio del trabajo:**

- Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
- Antes de iniciar cualquier procedimiento limpiar con alcohol Etílico al 70% o Hipoclorito de sodio al 10% las superficies de las mesas de trabajo.
- Utilizar contenedores de descarte para objetos punzo cortantes y biocontaminados.

Numeración:

Verificar la calidad de las muestras extraídas, por ejemplo:

- Presencia de coágulos
- Identificación en tubo de colección
- Orden de laboratorio
- Anticoagulante

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE SIN SELECCIÓN CELULAR

Numerar en orden correlativo cada una de las muestras extraídas consignando los siguientes datos:

- Examen solicitado
- Fecha de la toma de muestra
- Tipo de estudio: Post Trasplante
- Fecha de Trasplante
- Días después de trasplante

El código asignado debe estar indicado en la orden de laboratorio como en el tubo que contiene la muestra. Ejemplo

- Q16-001C1: Control 1 del Trasplante con número 001, en caso sea el segundo control, lo asignaremos como Q16-001C2 y así en lo sucesivo

Mezclar las muestras por inversión.

Al Final del trabajo:

- Limpiar la superficie de la mesa de trabajo utilizada.
- Dejar los materiales utilizados en su lugar respectivo.
- Eliminar los guantes y/o otros materiales descartables en los reservorios adecuados (bolsa roja).
- Lavarse las manos con jabón desinfectante disponible.

a.2. Extracción de ADN genómico (60 minutos)**a.1. Preparación de reactivos**

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

a.2. Proceso de Extracción

- Rotular en orden ascendente el número de crioviales necesarios según la lista de trabajo del día.
- Mezclar por inversión los tubos al vacío que contienen la muestra a evaluar (Aproximadamente por 10 segundos).
- Cargar 200 ul de Sangre total fresca o congelada en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 o 2.0 ul.
- Agregar 30 ul de Proteinasa K
- Adicional 20 ul de RNAasa A
- Mezclar por Vortex (Aproximadamente durante 5 segundos) e incubar a 56 °C por 20 minutos (calor seco).
- Transcurrido el tiempo, adicionar 200 ul de Etanol absoluto y mezclar por Vortex.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE SIN SELECCIÓN CELULAR

a.3. Unión a la Columna

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

a.4. Lavados

- Agregar 500 ul de Wash Buffer 1
- Centrifugar la columna a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un nuevo tubo de colección
- Agregar 500 ul de Wash Buffer 2
- Centrifugar la columna a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente.
- Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml.

a.5. Elución

- Agregar 60 ul de Buffer de Elución.
- Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Proceder a la Cuantificación del ADN eluido.

a.6. Almacenamiento

- Almacenar a 4 °C si se va a utilizar el DNA extraído en corto tiempo o almacenar a -20°C por periodos más prolongados.

a.3. Amplificación por PCR en tiempo final (120 minutos)**Al inicio del trabajo:**

1. Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
2. Encender la Cabina de Bioseguridad asignada para la preparación y cargado de las reacciones de PCR.
3. Retirar los reactivos para la preparación de la mezcla de PCR del sistema de amplificación de fragmentos STR (24 marcadores) del congelador de -20 °C y dejar atemperar.
4. Colocar los tubos de PCR de 0.2 ml necesarios, según le número de casos a amplificar.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE QUIMERISMO POST TRASPLANTE SIN SELECCIÓN CELULAR

Preparación de la mezcla de PCR

1. Dispensar 15 ul de la mezcla de reacción STR en cada tubo de PCR.
2. Agregar 5 ul de la muestra y control de amplificación.
3. La cantidad de DNA a utilizar es de 1ng.
4. Initial denaturation 95°C/1 min
5. Establecer el número de ciclos (25, 26 ó 27)
6. Denaturación 94°C / 3 seg
7. Alineamiento-extensión 60° / 30 seg
8. Extensión final 60°C / 8 min
9. Hold 4°C al infinito

a.4. Electroforesis capilar

1. Preparar la mezcla de electroforesis capilar:
2. A cada muestra colocar 0.5 ul de Size standard LIZ 600, 9.5 ul de formamida y 1.0 ul de los amplicones
3. Denaturar a 95°C por 3 minutos y colocar en hielo directamente para promover la formación de ADN monocatenario.
4. Colocar en el analizador genético un número de muestras múltiplo de 8.
5. En caso se cuenten con un número menor de muestras completar los pocillos con 11 ul de Formamida HiDi

a.5. Análisis de resultados

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

b. Indicaciones**1. Indicaciones Absolutas**

Monitoreo del trasplante en muestra de sangre periférica del paciente.

2. Indicaciones Relativas

Monitoreo del trasplante en muestra de sangre periférica del paciente, el intervalo de tiempo es definido por el médico tratante.

c. Riesgos o complicaciones

Ninguna

d. Contraindicaciones

Ninguna

VIII. Limitaciones y Validez de los Resultados

- No cambie el ensayo. Es muy recomendable que un paciente monitorizado permanezca con el mismo tipo de ensayo durante el periodo completo de monitorización.
- No cambie la matriz de la muestra. Es muy recomendable usar la misma matriz de muestra durante el periodo completo de monitorización de cada paciente.
- Realizar ensayos de sensibilidad. Diseñar el estudio de quimeras artificiales para valorar la sensibilidad del ensayo.
- Para uso profesional. Este procedimiento es sólo para uso profesional y por personal debidamente formado.

IX. Recomendaciones

No aplica

X. Autores, fecha y lugar

Luis Martín Cruz Díaz, Blgo lcruz@insnsb.gob.pe

Madeley Aliaga Zamudio, Blgo maliaga@insnsb.gob.pe

Carla Mendez Rodriguez Chacón, MC cmendez@insnsb.gob.pe

Área de Biología Molecular

Febrero 2020 – Servicio de Patología Clínica

Vigencia: 1 año

XI. Anexos

No aplica

XII. Bibliografía

1. GlobalFiler™ Express PCR amplification Kit - User Guide
ThermoFisher Scientific – LifeTechnologies
2. DNA extraction. Manual Invitrogen DNA Mini Kit.