REPUBLICA DEL PERU



RESOLUCION JEFATURAL

Lima, 02 de SETIEMERTe 2020



VISTOS:

El Informe N° 0270-2020-DICON/INEN, de la Dirección de Control de Cáncer, el Memorando N° 862-2020-OGPP/INEN de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto y el Informe N° 0609-2020-OAJ/INEN de la Oficina de Asesoría Jurídica; y,

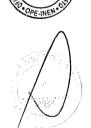


CONSIDERANDO:

Que a través de la Ley N° 28748, se creó como Organismo Público Descentralizado al Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas - INEN, con personería jurídica de derecho público interno, con autonomía económica, financiera, administrativa y normativa, adscrito al Sector Salud, constituyendo Pliego Presupuestal y calificado como Organismo Público Ejecutor en concordancia con la Ley N° 29158, Ley Orgánica del Poder Ejecutivo y el Decreto Supremo N° 034-2008-PCM;



Que, mediante Decreto Supremo Nº 001-2007-SA, publicado en el diario oficial El Peruano, el 11 de enero de 2007, se aprobó el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (ROF - INEN), estableciendo la jurisdicción, funciones generales y estructura orgánica del Instituto, así como las funciones de sus diferentes Órganos y Unidades Orgánicas;



Que, mediante Informe N° 270-2020-DICON/INEN, la Dirección de Control de Cáncer, remite el Memorando N° 862-2020-OGPP/INEN, de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto, con el cual alcanza los Informes N° 132- 2020-OO-OGPP/INEN elaborado por la Oficina de Organización y el Informe N° 801-2020-OPE-OGPP/INEN elaborado por la Oficina de Planeamiento Estratégico, mediante el cual emiten opinión favorable con respecto a los ocho (08) Anteproyectos de Procedimientos Normalizados de Trabajo del Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación - Departamento de Patología;

Que, de la revisión efectuada del Documento Normativo en cuestión elaborado por el Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación - Departamento de Patología, se aprecia que cumple con la estructura mínima señalada en la Directiva Administrativa N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la Elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas — INEN, aprobado mediante Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN, de fecha 10 de julio de 2019;

Que, en mérito al sustento técnico de la Oficina de Organización y del Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos, para la

aprobación de ocho (08) Procedimientos Normalizados de Trabajo del Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación - Departamento de Patología, corresponde emitir el acto resolutivo correspondiente para su aprobación;

Contando con los vistos buenos de la Sub Jefatura Institucional, de la Gerencia General, de la Dirección de Control dei Cáncer, del Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos, de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto y de la Oficina de Asesoría Jurídica;

Con las facultades conferidas en el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas - INEN, aprobado mediante Decreto Supremo N°001-2017-SA y la Resolución Suprema N°011-2018-SA;

SE RESUELVE:

ARTÍCULO PRIMERO.- APROBAR ocho (08) PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO DEL EQUIPO FUNCIONAL DE PATOLOGÍA CLÍNICA - ÁREA DE TRABAJO LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y CRIOPRESERVACIÓN, que en anexo forma parte integrante de la presente resolución.

ARTÍCULO SEGUNDO: Encargar a la Oficina de Comunicaciones la difusión de la Presente Resolución Jefatural, así como su publicación en la Página Web Institucional.

REGISTRESE, COMUNÍQUESE Y PUBLÍQUESE.

Dr. EDUARDO PAYET MEZA

ENFERMED

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS















PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO DEL ÁREA DE TRABAJO

LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y CRIOPRESERVACIÓN

TOMO I (08 PNTs)

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica – Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación









Elaborado por:	M.C. Roxana Regalado RafaelBlga. Claudia Morales Reyes	Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación. Equipo Funcional de Patología Clínica.
Revisado y validado	 Lic. Angel Winston Riquez Quispe Lic. Christian Pino Melliz Lic. Alexander Massa Villarto 	Oficina de Organización
øor:	 Mg. Piyo Félix Celestino Lázaro Lic. Angélica Mogollon Monteverde 	Oficina de Planeamiento Estratégico Unidad Funcional de Costos y Tarifas
Revisado y aprobado por	M.C. Iván Belzusarri PadillaLic. Yoseline Aznarán Isla	Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos





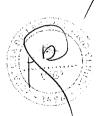














CONTENIDO

- PNT.DNCC.INEN. 119. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE EXTRACCIÓN DE ADN EN SANGRE PERIFÉRICA Y TEJIDOS V 0.1.
- PNT.DNCC.INEN. 120. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE AISLAMIENTO O EXTRACCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO ALTAMENTE PURUFICADO V 0.1.
- PNT.DNCC.INEN. 121. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPO A ANTÍGENOS DE LEUCOCITOS HUMANOS (HLA) DE CLASE I V 0.1.
- 4. PNT.DNCC.INEN. 122. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPO A ANTÍGENOS DE LEUCOCITOS HUMANOS (HLA) DE CLASE II V 0.1
- PNT.DNCC.INEN. 123. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA -A- SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA V 0.1.
- 6. PNT.DNCC.INEN. 124. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA -B- SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA V 0.1.
- PNT.DNCC.INEN. 125. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA -C- SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA V 0.1.
- PNT.DNCC.INEN. 126. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA -DR- SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA V 0.1.



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA Y TEJIDOS



I. **OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento para la extracción de DNA a partir de sangre periférica y teiidos.



- Código CPMS (MINSA): 83891.01
- Código Tarifario INEN: 240101



El presente documento normativo se emplea para la extracción de DNA a partir de sangre periférica y tejidos, en el Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación del Equipo Funcional de Patología Clínica.



RESPONSABILIDADES

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Área de Trabaio Histocompatibilidad y Criopreservación del Equipo Funcional de Patología Clínica:

- Médico Patólogo Clínico del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de supervisar el proceso.
- Biólogo/a del Grupo de Trabajo Extracción, del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de realizar la extracción de DNA en muestra biológica.
- Personal administrativo del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad v Criopreservación: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al procedimiento.



DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

Ver Manual de Terminología del Sistema de Gestión de la Calidad - SGC de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).



- La recepción de muestras para la extracción de DNA será de lunes a viernes de 8:00 h a 11:00 h.
- 6.2 La muestra fresca debe procesarse dentro de las seis horas posteriores a la toma de muestra.
- 6.3 En caso de no efectuarse el proceso en el plazo establecido (casos excepcionales) y con aprobación del encargado del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación, se puede conservar la muestra biológica hasta por 24 horas en refrigeración a temperatura de 1 a 6 °C.
- **6.4** Mantener el DNA extraído en un ambiente estéril para evitar su contaminación.
- 6.5 Manejar cuidadosamente los reactivos del kit de extracción de DNA a fin de evitar su contaminación.





INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

Histocompatibilidad y Criopreservación

- VB°
- **6.6** Asegurarse que todos los equipos incluyendo los tips de las micropipetas y los tubos de microcentrífuga se encuentren estériles cuando se pongan en contacto con el DNA.
- **6.7** Para minimizar la degradación del DNA realizar los pasos de lisado rápidamente y evitar las fluctuaciones de temperaturas a las que serán sometidas las muestras de DNA

VII. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

La epidemiología molecular estudia variaciones genotípicas relacionándolas con diversos procesos biológicos, entre ellos los patológicos como el cáncer. Actualmente, los estudios de epidemiología molecular tienen gran potencial como herramienta de diagnóstico y pronóstico y emplean métodos basados en la amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El procedimiento de extracción de DNA a partir de muestras biológicas tiene un impacto significativo sobre la sensibilidad y reproducibilidad de esta prueba molecular. Por ello, es de vital importancia desarrollar un método de extracción de DNA que permita obtener genoma amplificable con un óptimo rendimiento y bajo costo, aplicando la metodología en modelos experimentales, para luego proceder a realizarlos sobre las muestras clínicas (1).



Control Nacional

VIII. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA

El protocolo de separación inicia con el rompimiento del material inicial, ya sea de origen viral, bacteriano, vegetal o animal (2). El método empleado para romper la célula debe ser leve con el fin de causar el menor daño posible al DNA (3). La lisis celular se puede hacer por acción mecánica, pulverizando el tejido con hielo seco o nitrógeno líquido, o mediante la degradación enzimática de la pared celular y posterior lisis con detergentes de las membranas celulares. Seguido al rompimiento celular la mayoría de métodos involucran una desproteinización con un solvente orgánico, seguido de la precipitación de DNA con isopropanol o etanol y posterior solubilización usando un tampón (4).



INEN-

X. SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES MEDIOAMBIENTALES

Cumplir las Normas de Bioseguridad 7.2.4. Nivel de Bioseguridad 2 (BSL 2): MÁXIMA, Ver Manual de Bioseguridad (DI PC-PC MAN 02).



EQUIPAMIENTO

10.1 Equipos (médico, biomédico, electromecánico, informático):

- Equipo de baño maría
- Cámara de flujo laminar
- Microcentrífuga refrigerada
- Agitador (vortex mixer)
- Termobloque para laboratorio
- Fluorómetro
- Espectofotómetro Uv Vis
- Microcentrífuga con rotor para microtubos de 1.5 mL
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 24 000 Btu tipo piso techo
- Lectora de código de barras



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS







Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

idad y Control Na

- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Mandil descartable estéril talla estándar
- Papel bond 75 g tamaño A4

Salud

- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Papel lente para microscopio
- Plumón de tinta indeleble punta delgada
- Tubo para extracción de sangre con sistema de vacío de vidrio 8,5 mL con citrato de sodio
- Microtubo de 1.5 mL
- Tips con filtro 100 UI x 1000 unidades
- Tips con filtro 1000 UI x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 0.1 UI 10UI x 96 unidades
- Tubo de colección
- Tips estériles
- Tubo de polipropileno, fondoc cónico estéril x 15 mL
- Tóner de impresión para Hp cód. ref. 05 x Ce505XNegro



- Agua para PCR
- Alcohol etílico (Etanol absoluto) 99.8% P.A.x 2.5 L
- Kit de extracción de DNA genómico x 250 determinaciones, conteniendo:
 - Proteinasa K
 - ii. **ARNasa**
 - Buffer de Lisis iii.
 - Buffer de lavado I iv
 - Buffer de lavado II V.
 - νi. Buffer de elución
- 11.2.1 Materiales de control:
 - No aplica
- 11.2.2 Patrón o calibrador
 - No aplica

SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS

12.1 Servicios Técnicos:

Mantenimiento preventivo y correctivo de equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado







Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

Histocompatibilidad y Criopreservación

- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
 Monitor plano de 20 In
- Unidad central de proceso CPU de 3.1 ghz
- Teclado keyboard con puerto USB
- Mouse óptico con puerto USB

10.2 Instrumentales:

- Micro pipeta volumen fijo de 50 μL
- Micro pipeta volumen variable de 10 μL 100 μL
- Micro pipeta volumen variable de 1000 μL 5000 μL
- Gradilla de polipropileno
- Tijera de metal de 8 In

10.3 Mobiliario:

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal

10.4 Software:

- No aplica

XI. SUMINISTROS

11.1 Insumos y material:

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 21 g x 1 ln x 100 unidades
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Bolígrafo (lapicero) de tinta líquida punta fina color azul
- Bota descartable antideslizantes
- Criovial de polipropileno estéril 2.0 mL con tapa rosca con sopo
- Cuaderno empastado rayado tamaño A5 x 200 hojas
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 94 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Guante para examen descartable talla M x 100 unidades
- Hisopo de algodón con mango de madera 6 In x 100 unidades
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato resistente a golpes y salpicaduras













Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

Equipos eléctricos

Salud



- Agua
- Luz
- Telefonía, Internet

XIII. MUESTRA

13.1. Obtención de la muestra:

Ver DI PC-PC MAN 05: Obtención por punción venosa.

13.2. Sistema biológico:

- Sangre periférica.

13.3. Recipiente:

- Tubos vacoutainer con ACD, para la colección de sangre venosa periférica.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL, para el almacenamiento del DNA.

13.4. Conservación y manejo:

- Ver DI PC-HC INS 08.

🖎 XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Para desarrollar el procedimiento para la extracción de DNA a partir de sangre periférica y tejidos se realizan las siguientes actividades:

Toma de muestra:

- Recepción, atención y entrevista de pacientes: ver DI PC-HC INS 03.
- 14.1.2 Extracción de la muestra mediante punción venosa: ver DI PC-PC MAN 05.

14.2 Registro de muestra:

- 14.2.1 Registrar los nombres del paciente y postulantes en el DI PC-HC REG 28.
- 14.2.2 Registrar los nombres del paciente y postulantes en el formato electrónico Excel PROCESO HLA.

Extracción de DNA a partir de sangre periférica:

- 14.3.1 Luego de la recepción y validación de los tubos de muestra, se colocan en los racks respectivos.
- 14.3.2 Preparar un baño maría o bloque de calor a 55 °C.
- 14.3.3 Centrifugar las muestras según el DI PC INS 05 ítem 5.2
- 14.3.4 Extraer 200 uL de buffy coat de la muestra.
- 14.3.5 Adicionar a un tubo de micro centrifugación estéril de 1.5 mL: 200 uL de Buffy coat + 20 uL de Proteinasa K +20 uL ARNasa.
- 14.3.6 Mezclar bien en el homogenizador de forma suave.
- 14.3.7 Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 14.3.8 Adicionar a la mezcla anterior 200 uL de Buffer de Lisis.

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: www.inen.sld.pe e-mail: postmaster@inen.sld.pe



Control Nacio

INEN.



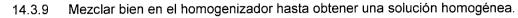


Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

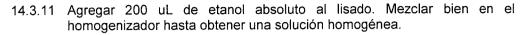
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

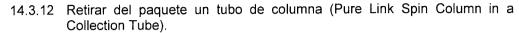
Histocompatibilidad y Criopreservación

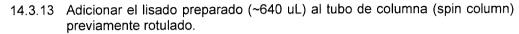




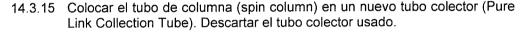
14.3.10 Incubar durante 10 minutos a 55 °C para promover la digestión proteica.





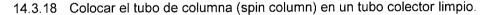


14.3.14 Centrifugar el tubo de columna (spin column) a 10 000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente (20°C).



14.3.16 Adicionar al tubo de columna (spin column) 500 uL del buffer de lavado I.

14.3.17 Centrifugar el tubo de columna (spin column) a 10 000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente.



14.3.19 Descartar el tubo colector usado.

14.3.20 Adicionar al tubo de columna (spin column) 500 uL del buffer de lavado II.

14.3.21 Centrifugar el tubo de columna a temperatura ambiente a 20 000 g durante 3 minutos.

14.3.22 Colocar el tubo de columna en un microtubo estéril de 1.5 mL (rotulado).

14.3.23 Descartar el tubo colector usado.

14.3.24 Adicionar al tubo de columna 50 - 100 uL del buffer de elución.

14.3.25 Incubar a temperatura ambiente por 1 min.

14.3.26 Centrifugar el tubo de columna a 20 000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente.

14.3.27 El tubo contiene DNA purificado.

14.3.28 Para recuperar más DNA, se puede realizar una segunda elución usando 100 uL del mismo buffer, como en la primera elución en otro microtubo estéril de 1.5 mL.

14.3.29 Centrifugar la columna a máxima velocidad durante 75 segundos a temperatura ambiente.

14.3.30 El tubo contiene DNA purificado. Ver ANEXO Nº 1.

14.3.31 Remover y descartar el tubo de columna (spin column)

14.3.32 Conservar el DNA purificado a -20°C o emplear para la técnica elegida.

14.3.33 Para un almacenamiento prolongado, conservar el DNA purificado en Buffer de elución a - 20°C (el DNA almacenado en agua es sujeto a hidrólisis ácida).

14.3.34 Para evitar el congelamiento repetido y consecuente daño al DNA, preservar el DNA purificado en 4 °C para el uso inmediato o alicuotar el DNA y conservar a -20 °C para el almacenamiento prolongado.

















Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



Control Na

14.4 Cuantificación de DNA:

14.4.1 Cuantificación de DNA: ver DI PC-HC INS 16.

14.5 Almacenamiento de la muestra:

14.5.1 Almacenamiento de muestras: ver DI PC-HC INS 08.

14.6 Elaboración y entrega de resultado:

- 14.6.1 Registrar los resultados en el DI PC-HC REG 28.
- 14.6.2 Registrar los resultados en el formato electrónico excel PROCESO HLA (DI PC HC FOR 18).

XV. CONTROL DE LA CALIDAD ANALÍTICA

Cálculo de datos: No aplica.



16.1 Rango de valores a informar:

Sub análisis 1: Cuantificación de DNA

- Numérico

Sub análisis 2: Pureza de DNA

- Numérico

16.2 Rangos de alarma:

Sub análisis 1: Cuantificación de DNA

- Numérico: menor a 20 ng/uL - mayor a 1000 ng/uL

Sub análisis 2: Pureza de DNA

- Numérico: menor a 1.6 y superior a 2.0

16.3 INTERVALOS DE REFERENCIA

Sub análisis 1: Cuantificación de DNA

- Numérico

Sub análisis 2: PUREZA DE DNA

- Numérico: entre 1.6 y 2.0

XVII/ REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 15 (Cus)
- 1. Tiscornia, M., Cubilla, M., Lorenzati, M., Cariaga Martínez, A., & Zapata, P. (2010). Estandarización de un método para la extracción de dna a partir de muestras clínicas parafinadas. Rev. Cienc. Tecnol., 53-57.
- 2. Thomson, D., Brown, N., & Clague, A. (1992). Routine use of hair root or buccal swab specimens for PCR analysis: advantages over using blood. Clinical Chimica Acta, 169-174.
- 3. Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. Journal of Visualizad Experiments, e2565-2570.
- 4. Life tehnologies, C. (2012). PureLink Genomic DNA kits. Purification of Genomic DNA. USA.







Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

Histocompatibilidad y Criopreservación



XVIII. ANEXOS:

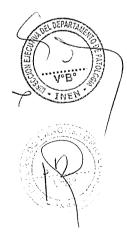
- Anexo N° 1: Control de registros
- Anexo N° 1: Control de cambios y mejoras.















Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



ANEXO Nº 1

CONTROL DE REGISTROS

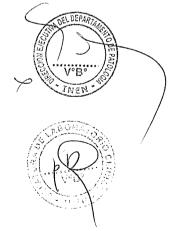




CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	NOMBRE DEL REGISTRO	LUGAR DE ALMACENAMIENTO (TIEMPO) USO / TEMPORAL	RESPONSABLE DE PROTECCIÓN	TIEMPO DE ARCHIVO
 DI PC-HC REG 06	MANUALES DE PROCEDIMIENTOS TOMO I	Estante documentario Sector 2 (2 años) / sector de almacenamiento 1 (8 años)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	10 años
DI PC HC REG 28	MEDICIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PUREZA - DNA	Estante documentario Sector B (2 años) / sector de almacenamiento 1 (8 años)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	10 años











Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

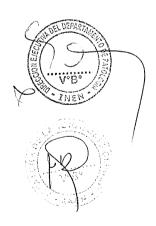
Histocompatibilidad y Criopreservación

ANEXO N° 2

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

(V°B°	CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
OBE-INEN	VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
Argunemon & Argune	01	1 - 10	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN). Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.	18/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael









Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de
Histocompatibilidad y Criopreservación



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE AISLAMIENTO O EXTRACCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO ALTAMENTE PURIFICADO



Normalizar el procedimiento para el aislamiento o extracción de ácido nucleico altamente purificado en hisopado bucal.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS

- Código CPMS (MINSA): 83891
- Código Tarifario INEN: 240102



II. ALCANCE

El presente documento normativo se emplea para el aislamiento o extracción de ácido nucleico altamente purificado, en el Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación del Equipo Funcional de Patología Clínica.



RESPONSABILIDADES

- Médico Patólogo Clínico del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de supervisar el proceso.
- Biólogo/a del Grupo de Trabajo Extracción, del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de realizar la extracción de DNA en muestra biológica.
- Personal administrativo del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al procedimiento.



DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

 Ver Manual de Terminología del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).



. LINEAMIENTOS

- **6.1** La recepción de muestras para el aislamiento o la extracción de DNA será de lunes a viernes de 8:00 h a 11:00 h.
- **6.2** La muestra fresca debe procesarse dentro de las seis horas posteriores a la toma de muestra.
- 6.3 En caso de no efectuarse el proceso en el plazo establecido (casos excepcionales) y con aprobación del encargado del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación, se puede conservar la muestra biológica hasta por 24 horas en refrigeración a temperatura de 1 a 6 °C.
- 6.4 Mantener el DNA extraído en un ambiente estéril para evitar su contaminación.
- **6.5** Manejar cuidadosamente los reactivos del kit de extracción de DNA a fin de evitar su contaminación.
- **6.6** Asegurarse que todos los equipos incluyendo los tips de las micropipetas y los tubos de microcentrífuga se encuentren estériles cuando se pongan en contacto con el DNA.





INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

Para minimizar la degradación del DNA, se debe realizar los pasos de lisado 6.7 rápidamente y evitar las fluctuaciones de temperaturas a las que serán sometidas las muestras de DNA.

VII. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

La epidemiología molecular estudia variaciones genotípicas relacionándolas con diversos procesos biológicos, entre ellos los patológicos como el cáncer. Actualmente, los estudios de epidemiología molecular tienen gran potencial como herramienta de diagnóstico y pronóstico y emplean métodos basados en la amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El procedimiento de extracción de DNA a partir de muestras biológicas tiene un impacto significativo sobre la sensibilidad y reproducibilidad de esta prueba molecular. Por ello es de vital importancia desarrollar un método de extracción de DNA que permita obtener genoma amplificable con un óptimo rendimiento y bajo costo, aplicando la metodología en modelos experimentales, para luego proceder a realizarlos sobre las muestras clínicas (1).

/III. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA

El protocolo de separación inicia con el rompimiento del material inicial, ya sea de origen viral, bacteriano, vegetal o animal (2). El método empleado para romper la célula debe ser leve con el fin de causar el menor daño posible al DNA (3). La lisis celular se puede hacer por acción mecánica, pulverizando el tejido con hielo seco o nitrógeno líquido, o mediante la degradación enzimática de la pared celular y posterior lisis con detergentes de las membranas celulares. Seguido al rompimiento celular la mayoría de métodos involucran una desproteinización con un solvente orgánico, seguido de la precipitación de DNA con isopropanol o etanol y posterior solubilización usando un tampón (4).

SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES MEDIOAMBIENTALES

Cumplir las Normas de Bioseguridad 7.2.4. Nivel de Bioseguridad 2 (BSL 2): Máxima. Ver Manual de Bioseguridad (DI PC-PC MAN 02).

EQUIPAMIENTO

10.1 Equipos (médico, biomédico, electromecánico, informático):

- Equipo de baño maría
- Cámara de flujo laminar
- Microcentrifuga refrigerada
- Agitador (vortex mixer)
- Termobloque para laboratorio
- Fluorómetro
- Espectofotómetro
- Microcentrífuga con rotor para microtubos de 1.5 mL
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 24000 BTU tipo piso techo
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20 In



Calidad y Control Nac







Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

- Unidad central de proceso CPU de 3.1 ghz
- Teclado keyboard con puerto USB
- Mouse óptico con puerto USB

10.2 Instrumentales:

- Micro pipeta volumen fijo de 50 uL
- Micro pipeta volumen variable de 10 uL 100 uL
- Micro pipeta volumen variable de 1000 uL 5000 uL
- Gradilla de polipropileno
- Tijera de metal de 8 In

10.3 Mobiliario:

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal.

10.4 Software:

- No aplica

XI. SUMINISTROS

11.1 Insumos y material:

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 21 g x 1 ln x 100 unidades
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Bolígrafo (lapicero) de tinta líquida punta fina color azul
- Bota descartable antideslizante
- Crioval de polipropileno estéril 2.0 mL con tapa rosca
- Cuaderno empastado rayado tamaño A5 x 200 hojas
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 94 mL
- Guante para examen descartable talla M x 100 unidades
- Gorro descartable unisex
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Mandil descartable estéril talla estándar
- Microtubo de 1.5 mL







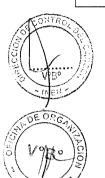








Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



- Papel bond 75 g tamaño A4
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato resistente a golpes y salpicaduras
- Tubo para colección de hisopado bucal
- Tips con filtro 100 UI x 1000 unidades
- Tips con filtro 1000 UI x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 0.1 UI 10 UI x 96 unidades
- Tubo de colección
- Tips estériles
- Tubo para extracción de sangre con sistema de vacío de vidrio 8.5 mL con citrato de sodio
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 mL
- Tóner de impresión para Hp cód. ref. 05 x Ce505XNegro



11.2 Reactivos:

- Tampón buffer PBS
- Agua para PCR
- Alcohol etílico (Etanol absoluto) 99.8% P.A.
- Kit de extracción de DNA genómico x 250 determinaciones, conteniendo:
 - Proteinasa K İ.
 - **ARNasa** ΙÏ.
 - iii. Buffer de Lisis
 - Buffer de lavado I iv.
 - Buffer de lavado II ٧.
 - Buffer de elución νi.



11.2.1 Materiales de control:

- No aplica
- 11.2.2 Patrón o calibrador
 - No aplica



XII. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS

12.1 Servicios Técnicos:

Mantenimiento preventivo y correctivo de equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



12.2 Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono/internet



XIII. MUESTRA

13.1. Obtención de la muestra:

- Ver DI PC-PC MAN 05: Obtención por punción venosa.

13.2. Sistema biológico:

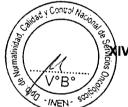
Sangre periférica.

13.3. Recipiente:

- Tubos de colección conteniendo tampón buffer PBS 10 mL, para la colección del hisopado bucal.
- Tubos EPPENDORF de 1.5 mL, para el almacenamiento del DNA.



Ver DI PC-HC INS 08



IV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Para desarrollar el procedimiento de Aislamiento o extracción de ácido nucléico altamente purificado, se realizan las siguientes actividades:

14.1 Toma de muestra:

- 14.1.1 Recepción, atención y entrevista de pacientes: ver DI PC-HC INS 03.
- 14.1.2 Extracción de la muestra mediante punción venosa: ver DI PC-PC MAN 05.

14.2 Registro de muestra:

- Registrar los nombres del paciente y postulantes en el DI PC-HC REG 28. 14.2.1
- 14.2.2 Registrar los nombres del paciente y postulantes en el formato electrónico Excel PROCESO HLA.

Extracción de DNA en hisopado bucal:

- 14.3.1 Poner el baño maría a 37 °C.
- 14.3.2 Preparar la mezcla de lisis: para cada muestra, mezcle 1 mL de Buffer de Lisis (L11) y 10 UI de proteinasa K.
- 14.3.3 Homogenizar el tubo que contiene las perlas magnéticas para suspender totalmente y distribuir uniformemente las perlas en el buffer de almacenaje.
- 14.3.4 Prepare una Mezcla de Purificación: para cada muestra, mezcle 40 uL perlas Magnéticas y 100 uL Buffer de Purificación (N6). Si usted aísla el DNA de múltiples muestras, se puede aumentar el volumen de reactivo usado y preparar un Master Mix de Purificación.
- 14.3.5 Para la preparación del lisado, transfiera la muestra de células bucales humanas a un tubo estéril de micro centrífuga.











INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación















- Adicione 1 mL del Mix de Lisis al tubo, asegurando que la muestra esté 14.3.6 completamente sumergida en el Mix de Lisis.
- Incubar la muestra a 37° C por 20 minutos. Continuar con la unión del 14.3.7 DNA.
- Para la unión del DNA, transferir el sobrenadante digerido a un tubo nuevo 14.3.8 estéril de microcentrífuga.
- Pipetear con cuidado de arriba a abajo la Mezcla de Purificación que 14.3.9 contiene las Perlas Magnéticas para resuspender totalmente de nuevo las
- 14.3.10 Adicionar a la muestra 140 uL de la mezcla de purificación y pipetear de arriba abajo con cuidado 5 veces para que se mezcle. Usar una punta de 1 mL ajustado a 900 uL para mezclar la muestra. Asegurarse que la punta esté sumergida, y pipetear de arriba abajo con cuidado para evitar formar burbujas.
- Incubar a To ambiente por 1 min para permitir la unión del DNA a las perlas 14.3.11 magnéticas.
- Colocar la muestra en el soporte magnético durante 1 minuto o hasta que 14.3.12 las cuentas hayan formado un pellet compacto.
- Sin quitar el tubo soporte magnético, remover con cuidado el sobrenadante y descarte. Tener cuidado de no tocar el pellet de perlas con la pipeta de modo que la punta esté lejos del pellet.
- Lavado del DNA, sin quitar el tubo del soporte magnético, agregue a la muestra 1 mL del buffer de lavado (W12). Agregar el buffer de lavado directamente sobre las perlas magnéticas de tal modo que las perlas brevemente queden suspendidas de nuevo en la solución.
- Dejar la muestra en el soporte magnético durante 1 minuto o hasta que las 14.3.15 perlas havan formado un pellet compacto.
- Sin quitar el tubo del soporte magnético, con cuidado quitar el 14.3.16 sobrenadante y descarte. Tener cuidado de no tocar el pellet de perlas con la punta de la pipeta.
- Respecto a la elución del DNA se debe quitar el tubo que contiene las perlas magnéticas del soporte magnético. No deberá haber ningún sobrenadante en el tubo.
- Añadir 150 uL del buffer de elución (E5) (o el Buffer TE, pH 8.5) al tubo y 14.3.18 pipetear de arriba a abajo con cuidado 10 veces para suspender de nuevo las perlas magnéticas. No usar agua para la elución. El DNA no eluirá debido a la baja capacidad buffer del agua.
- 14.3.19 Incubar a To ambiente por 1 min.
- Coloque la muestra en el soporte magnético durante 1 minuto o hasta que las perlas hayan formado un pellet compacto.
- Sin quitar el tubo del soporte magnético, con cuidado retirar el 14.3.21 sobrenadante que contiene el DNA a un tubo estéril de microcentrífuga. Tener cuidado de no remover el pellet de perlas con la punta de la pipeta. Si el eluido que contiene DNA es decolorado, repetir los pasos 14.3.18 -14.3.20.



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



14.4 Cuantificación de DNA:

14.4.1 Cuantificación de DNA: ver DI PC-HC INS 16.

14.5 Almacenamiento de la muestra:

14.5.1 Almacenamiento de muestras: ver DI PC-HC INS 08.

14.6 Elaboración y entrega de resultado:

- 14.6.1 Registrar los resultados en el DI PC-HC REG 28.
- 14.6.2 Registrar los resultados en el formato electrónico excel PROCESO HLA (DI PC HC FOR 18).



Contro! Na

XV. CONTROL DE LA CALIDAD ANALÍTICA

Cálculo de datos: NO APLICA

XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS

16.1 Rango de valores a informar:

Sub análisis 1: Cuantificación de DNA

Numérico

Sub análisis 2: Pureza de DNA

- Numérico

16.2 Rangos de alarma:

Sub análisis 1: Cuantificación de DNA

- Numérico: menor a 20 ng/uL - mayor a 1000 ng/uL

Sub análisis 2: Pureza de DNA

- Numérico: menor a 1.6 y superior a 2.0



Sub análisis 1: Cuantificación de DNA

- Numérico

Sub análisis 2: Pureza de DNA

Numérico: entre 1.6 y 2.0





- 1. Tiscornia, M., Cubilla, M., Lorenzati, M., Cariaga Martínez, A., & Zapata, P. (2010). Estandarización de un método para la extracción de dna a partir de muestras clínicas parafinadas. Rev. Cienc. Tecnol., pp.53-57.
- 2. Thomson, D., Brown, N., & Clague, A. (1992). Routine use of hair root or buccal swab specimens for PCR analysis: advantages over using blood. Clinical Chimica Acta, pp.169-174.
- 3. Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. Journal of Visualizad Experiments, e2565-2570.
- 4. Life tehnologies, C. (2012). PureLink Genomic DNA kits. Purification of Genomic DNA. USA.





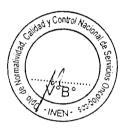
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

XVIII. ANEXOS

- Anexo N° 1: Control de Registros
- Anexo N° 1: Control de cambios y mejoras.

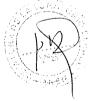














Sector

Salud



PNT.DNCC.INEN.120. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE AISLAMIENTO O EXTRACCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO ALTAMENTE PURIFICADO-V.01

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



ANEXO Nº 1

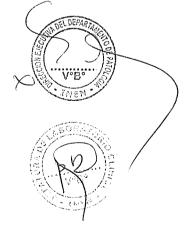
CONTROL DE REGISTROS



	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	NOMBRE DEL REGISTRO	LUGAR DE ALMACENAMIENTO (TIEMPO) USO / TEMPORAL	RESPONSABLE DE PROTECCIÓN	TIEMPO DE ARCHIVO
	DI PC-HC REG 06	MANUALES DE PROCEDIMIENTOS TOMO I	Estante documentario Sector 2 (2 años) / sector de almacenamiento 1 (8 años)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	10 años
08	DI PC HC REG 28	MEDICIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PUREZA - DNA	Estante documentario Sector B (2 años) / sector de almacenamiento 1 (8 años)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	10 años









INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS





Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

Histocompatibilidad y Criopreservación



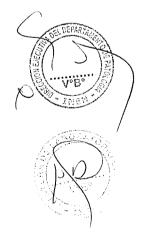
SE ORGA

ANEXO N° 2

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

(V/B°)		CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
PE-INEW	VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	
Control Manager Control Manage	01	1 - 10	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN). Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.	18/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael	









Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPO A ANTÍGENOS DE LEUCOCITOS HUMANOS (HLA) CLASE I



I. OBJETIVO

Normalizar el procedimiento para la detección de anticuerpos frente a los Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) de clase I.



II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS

- Código CPMS (MINSA): 86832
- Código Tarifario Institucional: 240118



El presente documento normativo se emplea para realizar el procedimiento de detección de anticuerpos a Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) de Clase I en suero humano, en el Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación del Equipo Funcional de Patología Clínica.



RESPONSABILIDADES

- Médico Patólogo Clínico del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de supervisar el proceso y emitir los resultados de análisis.
- Biólogo/a del Grupo de Trabajo Análisis del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de realizar el proceso y emitir los resultados de análisis.
- Personal administrativo del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al procedimiento.



V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

 Ver Manual de Terminología del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).



I. LINEAMIENTOS

- **6.1** El presente documento normativo se elabora con base en los instructivos emitidos por el fabricante.
- 6.2 La prueba se realiza de acuerdo a la programación diaria de los grupos de trabajo.
- 6.3 Los reactivos se suministran al usuario final en hielo seco. El envase completo se puede almacenar en un congelador a una temperatura de -65 °C o inferior hasta el primer uso, hasta la fecha de caducidad impresa.
- 6.4 Una vez que se descongelan las perlas, no deben volver a congelarse. Almacenar a una temperatura de 2 8 °C hasta tres meses o hasta su fecha de caducidad (si es anterior).
- 6.5 Después del primer uso, se debe almacenar el buffer de lavado a una temperatura de 2 8 °C hasta tres meses o hasta su fecha de caducidad, si es anterior.

Página 1 de 12



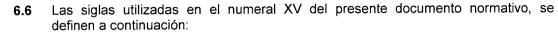


INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

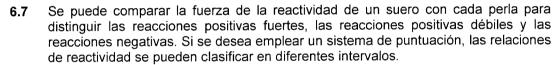


Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad v Criopreservación





- Relación NBG: Relación normalizada de fondo utilizada para asignar la fuerza de cada reacción anti-HLA
- S#N: Valor de la fluorescencia específico de la muestra para el perla número N.
- Perla SNC: Valor de la fluorescencia específico de la muestra para la perla del control negativo
- BG#N: Valor de la fluorescencia del suero de control negativo de fondo para el perla número N.
- Perla BGNC: Valor de la fluorescencia del suero de control negativo de fondo para la perla del control negativo.
- Suero NC: Suero de control negativo validado para un lote determinado de



- Las relaciones NBG > 1.5 con la prueba se correlacionan bien con las reacciones 6.8 positivas.
- Si (perla BG#N-BGNC) < 50 entonces utilizar 50 como el valor umbral 6.9 predeterminado.



SIGNIFICANCIA CLÍNICA

La detección de anticuerpos a Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) clase I en suero de pacientes es un procedimiento de gran utilidad para conocer el grado de aloinmunización humoral del paciente y los posibles donantes, expresándose en porcentales con un valor máximo de 100% (1).



VIII. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA

El método mixto detecta la presencia de anticuerpos frente a los Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) de clase I, clase II o ambas clases. Las pruebas PRA pueden detectar anticuerpos y sus especificidades frente a los Antigenos de Leucocitos Humanos (HLA) en cada panel (2). El método del antígeno aislado, permite confirmar la especificidad del anticuerpo sugerida por una prueba PRA previa, mientras que las perlas individuales para aislados se usan para concentrarse en reacciones contra uno o algunos pocos antígenos. por ejemplo, para comparar la reactividad de diferentes muestras de suero provenientes del mismo individuo (3). Se utiliza un suero de control negativo para establecer el valor de fondo de cada perla de un lote de pruebas (4).



SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES MEDIOAMBIENTALES

Cumplir las Normas de Bioseguridad 7.2.4. Nivel de Bioseguridad 2 (BSL 2): máxima. Ver Manual de Bioseguridad (DI PC-PC MAN 02).



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de
Histocompatibilidad y Criopreservación



X. EQUIPAMIENTO

10.1 Equipos (médico, biomédico, electromecánico, informático):

- Citómetro de flujo Sistema Luminex 200: consumibles
- Citómetro de flujo Sistema Luminex 200: calibradores
- Centrifuga para placas
- Congeladora eléctrica vertical hasta -80° C
- Congeladora eléctrica vertical hasta -20° C
- Refrigeradora doméstica
- Microcentrífuga
- Termociclador
- Vortex mixer
- Cámara de flujo laminar
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 24 000 Btu tipo piso techo
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20 In
- Unidad central de proceso CPU de 3.1 ghz
- Teclado keyboard con puerto USB
- Mouse óptico con puerto USB

10.2 Instrumentales:

- Micropipeta de volumen variable 0.1 uL- 10 uL
- Micropipeta de volumen variable 20 uL 200 uL
- Micropipeta automática de rango variable 200 1000 uL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 0.5 uL 10 uL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 10 uL 100 uL
- Gradilla de polipropileno para 96 Tubos de 1.5 mL 2 mL
- Tijera de metal de 8 In

10.3 Mobiliario:

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal













INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS





Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

Histocompatibilidad y Criopreservación



10.4 Software:

- Tecnología Luminex



XI. SUMINISTROS

11.1 Insumos y material:

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 21 g x 1 ln x 100 unidades
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Bota descartable antideslizante
- Bolígrafo(lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Cuaderno empastado rayado tamaño A5 x 200 hojas
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 94 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Criovial de polipropileno estéril 2.0 mL con tapa rosca
- Guante para examen descartable talla M x 100 unidades
- Gorro descartable unisex
- Mascarilla descartable quirúrgico 3 pliegues
- Jabón germicida líguido x 800 mL
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tubo para colección de hisopado bucal
- Tips con filtro 100 uL
- Tips con filtro 1000 uL
- Tips estéril con filtro 0.1 uL
- Microtubo de 1.5 mL
- Tubo de colección
- Tips estériles
- Tóner de impresión para Hp cód. ref. 05X Ce505X negro
- Tubo para extracción de sangre con sistema de vacío de vidrio 8.5 mL con citrato de sodio.



11.2 Reactivos:

- Agua destilada
- Anti-IgG humana de cabra conjugada con PE
- Tampón Fosfato Salino (Buffer PBS)
- Mix de perlas de detección clase I 125 μL por vial







Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



- Buffer de Lavado 10X 2 x 13 ml por envase
- Alcohol etílico (Etanol) 99.8% P.A. x 2.5 L
- Kit Panel de antígenos purificados para detección de anticuerpos Anti HLA Clase I x 25 determinaciones

11.2.1 Materiales de Control:

- Suero de control negativo, que no contiene anticuerpos frente al HLA.
- Tubos de microcentrifugación o microtubo estéril de 1.5 mL
- Microtubo de 1.5 mL
- Tubo de colección
- Puntas de pipeta estériles

11.2.2 Patrón o Calibrador:

- Perla calibradoras del equipo Luminex



XII. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS

12.1 Servicios Técnicos:

Mantenimiento preventivo y correctivo de equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos

12.2 Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono/Internet

KIII. MUESTRA

13.1. Obtención de la muestra:

- Ver DI PC-PC MAN 05: Obtención por punción venosa.

13.2. Sistema biológico:

- Suero humano.

13.3. Recipiente:

- Tubos vacoutainer sin anticoagulante, para la colección de sangre periférica.
- Tubos de polipropileno de 1.5 mL, para el almacenamiento del suero extraído.

13.4. Conservación y manejo:

Mantener el suero almacenado por un tiempo no mayor a 4 días posterior a la extracción de la muestra.







Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad v Criopreservación



XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Para desarrollar el procedimiento de Detección de anticuerpos a antígenos de leucocitos humanos (HLA) de Clase I, se realizan las siguientes actividades:

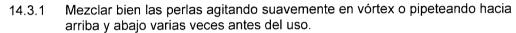
14.1 Toma de muestra:

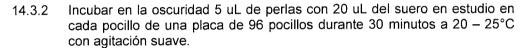
- Recepción, atención y entrevista de pacientes: ver DI PC-HC INS 03. 14.1.1
- Extracción de la muestra mediante punción venosa: ver DI PC-PC MAN 14.1.2



- 14.2.1 Registro de muestra
- Registrar los nombres del paciente y postulantes en el DI PC-HC REG 28. 14.2.2
- Registrar los nombres del paciente y postulantes en el formato electrónico 14.2.3 excel proceso HLA.







- Diluir tampón de lavado 10X en agua destilada para obtener una solución 14.3.3 de lavado 1X.
- 14.3.4 Después de la incubación, añadir 150 uL de tampón de lavado 1X a cada pocillo de la placa. Cubra con cierre para bandeja y agite en un vórtex.
- Centrifugar a 1.300 g durante 5 minutos. 14.3.5
- Retirar el tampón de lavado de los pocillos de la placa agitando las 14.3.6 bandejas o mediante aspiración por vacío.
- Añadir 200 uL de tampón de lavado 1X a cada pocillo de la placa. Cubra la 14.3.7 bandeia con un cierre nuevo y agite en un vórtex. Centrifugar a 1.300 g durante 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante de los pocillos de la placa agitando las bandejas o 14.3.8 mediante aspiración por vacío.
- Añadir 100 uL de anti-IgG humana conjugada con PE 1X a cada pocillo. 14.3.9 Cubra con cierre para bandeja y agite en un vórtex. Incube en la oscuridad durante 30 minutos a 20 - 25 °C con agitación suave.
- 14.3.10 Centrifugar a 1.300 g durante 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante de los pocillos de la placa agitando las bandejas o 14.3.11 mediante aspiración por vacío.
- Luego de la recepción y validación de los tubos de muestra, se colocarán 14.3.12 en los racks respectivos.
- Seleccionar una plantilla de acuerdo con el ID del catálogo y el número de 14.3.13 lote del kit del producto.











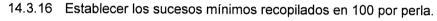


Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



- 14.3.14 Luego se debe crear un nombre de archivo para las muestras que se analizarán.
- 14.3.15 Asegurarse de que la configuración de la plantilla sea correcta. Las especificaciones de la plantilla son:
 - Establezca el volumen de la muestra hasta 50 uL.
 - Establezca el tiempo de espera para la muestra en 80 segundos.
 - Establezca la separación del discriminador de doblete en 8.000 (límite inferior) y 16.000 (límite superior).
 - Establezca el número e ID de las perlas seleccionadas de acuerdo con la hoja de trabajo específica proporcionada con el producto.



- 14.3.17 Ingresar los ID de las muestras (si se analiza la misma muestra más de una vez, deberá asignarse un ID diferente.)
- 14.3.18 Cargar la placa en la plataforma XY.
- 14.3.19 Pulsar el botón START para iniciar la sesión. Después de finalizar el análisis de las muestras, se debe guardar los datos obtenidos en un archivo de tipo .csv.
- 14.3.20 Lavar el analizador dos veces con buffer de lavado, al final de la sesión.



- 14.4.1 Configurar el citómetro de flujo para la adquisición de muestras y la calibración según se indica en el manual del usuario.
- 14.4.2 Seleccionar una plantilla de acuerdo con el ID del catálogo y el número de lote del kit del producto.
- 14.4.3 Crear un nombre de archivo para las muestras que se analizarán.
- 14.4.4 Asegurarse de que la configuración de la plantilla sea correcta. Las especificaciones de la plantilla son:
 - Establecer el volumen de la muestra hasta 50 uL.
 - Establecer el tiempo de espera para la muestra en 80 segundos.
 - Establecer la separación del discriminador de doblete en 8.000 (límite inferior) y 16.000 (límite superior).
 - Establecer el número e ID de las perlas seleccionadas de acuerdo con la hoja de trabajo específica proporcionada con el producto.
- 14.4.5 Establecer los sucesos mínimos recopilados en 100 por perla.
- 14.4.6 Ingresar los ID de las muestras (si se analiza la misma muestra más de una vez, deberá asignarse un ID diferente.)
- 14.4.7 Cargar la placa en la plataforma XY.
- 14.4.8 Pulsar el botón START para iniciar la sesión. Después de finalizar el análisis de las muestras, guarde los datos obtenidos en un archivo de tipo csv.
- 14.4.9 Lavar el analizador dos veces con buffer de lavado, al final de la sesión.









INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

Histocompatibilidad y Criopreservación

14.5 Almacenamiento de la muestra:

14.5.1 Almacenamiento de muestras: ver DI PC-HC INS 08.

14.6 Elaboración y entrega de resultado:

- 14.6.1 Registrar los resultados en el DI PC-HC REG 28.
- 14.6.2 Registrar los resultados en el formato electrónico excel PROCESO HLA (DI PC HC FOR 18).

XV. CONTROL DE LA CALIDAD ANALÍTICA

- **15.1** El citómetro de flujo realiza el análisis de hasta 100 o 500 regiones por cada perla, en una única prueba.
- **15.2** La reactividad de una muestra en estudio se calcula a partir de los valores de fluorescencia "sin procesar" registrados por el dispositivo (archivo .csv) para cada perla recubierta con HLA.
- 15.3 Calcular la reactividad del suero anti-HLA corrigiendo por uniones no específicas a las perlas de control negativo y valores de fondo (obtenidos mediante el análisis del suero de control negativo), para determinar la relación normalizada de fondo (relación NBG). Véanse los cálculos, a continuación.

Relación NBG = (S#N/PERLASNC)/ (BG#N/PERLA BGNC).

- 15.4 Determinación del valor umbral positivo/negativo: seleccionar la relación NBG que muestra una desviación significativa sobre el valor de fondo de la fluorescencia cuando el valor de fondo se ha obtenido con el suero de control negativo en pruebas con 3 5 replicados.
- 15.5 Otra opción es analizar 5 10 muestras de suero de donantes varones que no hayan recibido transfusiones ni trasplantes para obtener un valor medio de fondo.
- 15.6 Validar el valor umbral utilizando 5 10 muestras de alosuero de referencia con una especificidad de anticuerpos frente al HLA definida. Los valores de la relación NBG de las reacciones positivas previstas de los antígenos deben ser superiores al valor umbral.
- 15.7 Se pueden observar reacciones adicionales positivas o negativas. Si es necesario, ajuste el valor umbral del método para que coincida con la sensibilidad de un método de detección de anticuerpos aceptado previamente.
- 15.8 Para suero de PRA alto, los antígenos propios del paciente pueden demostrar reacciones positivas débiles. En estos casos, el valor de fluorescencia para el antígeno propio del paciente puede utilizarse como valor umbral.
- **15.9** El valor umbral de la señal en relación con el fondo debe validarse si se utiliza un suero de control negativo nuevo.
- 15.10 Para un suero determinado, el valor de PC/NC debe ser superior a 2. Un valor inferior puede deberse a un valor de fondo de la perla del NC extremadamente elevado para el suero en estudio, una señal elevada de las perlas de HLA del control NS o a una señal baja del anticuerpo secundario o del analizador de flujo. En este caso, puede ser necesario confirmar los datos.
- **15.11** Cada usuario debe evaluar el rendimiento del método en su laboratorio para validar el valor umbral seleccionado.

















Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de
Histocompatibilidad y Criopreservación



- 15.12 Las muestras de plasma pueden dar valores más bajos de FI o valores más altos de fondo que aquellas de suero. El usuario podría preferir normalizar los datos al comparar resultados entre muestras de suero y plasma para un mismo o para diferentes sujetos de prueba.
- **15.13** Para calcular el porcentaje del PRA (anticuerpo reactivo de un panel), dividir el número de reacciones positivas entre el número de reacciones válidas de ese suero en estudio.
- **15.14** Para determinar la especificidad del anticuerpo frente al HLA, anotar la puntuación de la reacción en la hoja de trabajo específica del lote con el fin de analizar el patrón de la reacción.



16.1 Rango de valores a informar:

Sub análisis 1: Detección de anticuerpo a antígeno de leucocitos humanos HLA clase I.

- Porcentual



16.2 Rangos de alarma:

<u>Sub análisis 1: Detección de anticuerpo a antígeno de leucocitos humanos HLA clase I.</u>

- Porcentual: mayor a 80%

16.3 Intervalos de referencia:

Sub análisis 1: Detección de anticuerpo a antígeno de leucocitos humanos HLA clase I.

- Porcentual: 0 - 100%



XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Angaswamy N, Tiriveedhi V, Sarma NJ, Subramanian V, Klein C, Wellen J, et al. (2013). Interplay between immune responses to HLA and non-HLA self-antigens in allograft rejection. Hum Immunol.; 74(11):1478–1485.



- Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, van Huyen JP, Mooney N, et al. (2013). Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. N Engl J Med. 369(13):1215–1226.
- 3. Kardduss-Urueta A, Gale RP, Gutierrez-Aguirre CH, Herrera-Rojas MA, Murrieta Álvarez I, Perez-Fontalvo R et al. (2018). Freezing the graft is not necessary for autotransplants for plasma cell myeloma and lymphomas. Bone Marrow Transplant. 53(4):457-460.
- 4. Sarmiento M, Ramírez P, Parody R, Salas MQ, Beffermann N, Jara V et al. (2018). Advantages of non-cryopreserved autologous hematopoietic stem cell transplantation against a cryopreserved strategy. Bone Marrow Transplant. 53(8):960-966.





Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

Histocompatibilidad y Criopreservación



XVIII. ANEXOS

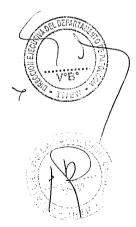
- Anexo N° 1: Control de Registros
- Anexo N° 2: Control de cambios y mejoras.















Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de
Histocompatibilidad y Criopreservación

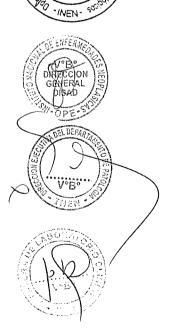


ANEXO N° 1

CONTROL DE REGISTROS

CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	NOMBRE DEL REGISTRO	LUGAR DE ALMACENAMIENTO (TIEMPO) USO / TEMPORAL	RESPONSABLE DE PROTECCIÓN	TIEMPO DE ARCHIVO
DI PC-HC REG 06	MANUALES DE PROCEDIMIENTOS TOMO I	Estante documentario Sector 2 (2 años) / sector de almacenamiento 1 (8 años)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	10 años









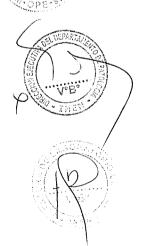
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



ANEXO N° 2

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

7	CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS					
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)		
O1	1 - 12	- Se elabora PNT según DA N° 001-2019- INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019- J/INEN). - Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.	18/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael		







Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPO A ANTÍGENOS DE LEUCOCITOS HUMANOS (HLA) **CLASE II**



I. **OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento para la detección de anticuerpos frente a los antígenos de leucocitos humanos (HLA) de Clase II.

11. **IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 86833
- Código Tarifario Institucional: 240119



ALCANCE

El presente documento normativo se emplea para realizar el procedimiento de detección de anticuerpos a antígenos de leucocitos humanos (HLA) de Clase II en suero humano, en el Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación del Equipo Funcional de Patología Clínica.



RESPONSABILIDADES

- Médico Patólogo Clínico del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de supervisar el proceso, y emitir los resultados de análisis.
- Biólogo/a del Grupo de Trabajo Análisis del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de realizar el proceso y emitir los resultados de análisis
- Personal administrativo del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al procedimiento.



V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

Ver Manual de Terminología del Sistema de Gestión de la Calidad - SGC de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).



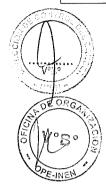
- 6/1 El presente documento normativo se elabora con base en los instructivos emitidos por el fabricante.
- 6.2 La prueba se realiza de acuerdo a la programación diaria de los grupos de trabajo.
- 6.3 Los reactivos se suministran al usuario final en hielo seco. El envase completo se puede almacenar en un congelador a una temperatura de -65 °C o inferior hasta el primer uso, hasta la fecha de caducidad impresa.
- 6.4 Una vez que se descongelan las perlas, no deben volver a congelarse. Almacene a una temperatura de 2 - 8 °C hasta tres meses o hasta su fecha de caducidad (si es anterior).



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad v Criopreservación



- 6.5 Después del primer uso, almacene el buffer de lavado a una temperatura de 2 - 8 °C hasta tres meses o hasta su fecha de caducidad, si es anterior.
- Las siglas utilizadas en el numeral XV del presente documento normativo, se definen a continuación:
 - Relación NBG: Relación normalizada de fondo utilizada para asignar la fuerza de cada reacción anti-HLA
 - S#N: Valor de la fluorescencia específico de la muestra para la perla número N.
 - Perla SNC: Valor de la fluorescencia específico de la muestra para la perla del control negativo.
 - BG#N: Valor de la fluorescencia del suero de control negativo de fondo para el perla número N.
 - Perla BGNC: Valor de la fluorescencia del suero de control negativo de fondo para la perla del control negativo.
 - Suero NC: Suero de control negativo validado para un lote determinado de perlas.



- 6.7 Se puede comparar la fuerza de la reactividad de un suero con cada perla para distinguir las reacciones positivas fuertes, las reacciones positivas débiles y las reacciones negativas. Si se desea emplear un sistema de puntuación, las relaciones de reactividad se pueden clasificar en diferentes intervalos.
- Las relaciones NBG > 1.5 con la prueba se correlacionan bien con las reacciones 6.8 positivas.
- Si (perla BG#N-BGNC) < 50 entonces utilizar 50 como el valor umbral 6.9 predeterminado.



VII. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

La detección de anticuerpos a Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) clase II en suero de pacientes es un procedimiento de gran utilidad para conocer el grado de aloinmunización humoral del paciente y los posibles donantes, expresándose en porcentajes con un valor máximo de 100% (1).



VIII. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA

El método mixto detecta la presencia de anticuerpos frente a los Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) de Clase I, Clase II o ambas clases. Las pruebas PRA pueden detectar anticuerpos y sus especificidades frente a los Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) en cada panel (2). El método del antígeno aislado, permite confirmar la especificidad del anticuerpo sugerida por una prueba PRA previa, mientras que las perlas individuales para aislados se usan para concentrarse en reacciones contra uno o algunos pocos antígenos. por ejemplo, para comparar la reactividad de diferentes muestras de suero provenientes del mismo individuo (3). Se utiliza un suero de control negativo para establecer el valor de fondo de cada perla de un lote de pruebas (4).



SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES MEDIOAMBIENTALES

Cumplir las Normas de Bioseguridad 7.2.4. Nivel de Bioseguridad 2 (BSL 2): máxima. Ver Manual de Bioseguridad (DI PC-PC MAN 02).



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS





Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



X. EQUIPAMIENTO

10.1 Equipos (médico, biomédico, electromecánico, informático):

- Citómetro de flujo Sistema Luminex 200: consumibles
- Citómetro de flujo Sistema Luminex 200: calibradores
- Centrífuga para placas
- Congeladora eléctrica vertical hasta -80 °C
- Congeladora eléctrica vertical hasta -20 °C
- Refrigeradora doméstica
- Microcentrífuga
- Termociclador
- Vortex mixer
- Cámara de flujo laminar
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 24 000 Btu tipo piso techo
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20 In
- Unidad central de proceso CPU de 3.1 ghz
- Teclado keyboard con puerto USB
- Mouse óptico con puerto USB



Contol Na

10.2 Instrumentales:

- Micropipeta de rango variable 0.1 10 uL
- Micropipeta de rango variable 20 uL- 200 uL
- Micropipeta de rango variable 200 uL 1000 uL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 0.5 uL 10 uL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 10 uL 100 uL
- Gradilla de polipropileno para 96 Tubos de 1.5 mL 2 mL
- Tijera de metal de 8 In



10.3 Mobiliario:

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal







Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

Histocompatibilidad y Criopreservación



10.4 Software:

- Tecnología Luminex

XI. SUMINISTROS



Outo Nec

11.1 Insumos y material:

- Aquia múltiple para extracción de sangre al vacío 21 g x 1 ln x 100 unidades
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Bota descartable antideslizante
- Bolígrafo(lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Cuaderno empastado rayado tamaño A5 x 200 hojas
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 94 mL
- Criovial de polipropileno estéril 2.0 mL con tapa rosca
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Guante para examen descartable talla M x 100 Unidades
- Gorro descartable unisex
- Jabón germicida líguido x 800 mL
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Mascarilla descartable quirúrgico 3 pliegues
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Microtubo de 1.5 mL
- Tubo para colección de hisopado bucal
- Tips con filtro 100 uL
- Tips con filtro 1000 uL
- Tips estéril con filtro 03*1 uL
- Tubo de colección
- Tips estériles
- Tóner de impresión para HP cód. ref. 05X Ce505X negro
- Tubo para extracción de sangre con sistema de vacío de vidrio 8.5 mL con citrato de sodio.



11.2 Reactivos:

- Agua destilada
- Anti-IgG humana de cabra conjugada con PE
- Tampón Fosfato Salino (Buffer PBS)
- Mix de perlas de detección Clase II 125 uL por vial
- Buffer de Lavado 10X 2 x 13 mL por envase







Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación































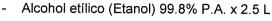












Kit Panel de antígenos purufucados para detección de anticuerpos anti HLA Clase II x 25 determinaciones

11.2.1 Materiales de Control:

Sector

Salud

- Suero de control negativo, que no contiene anticuerpos frente al HLA.
- Tubos de microcentrifugación o microtubo estéril de 1.5 mL
- Microtubo de 1.5 mL
- Tubo de colección
- Puntas de pipeta estériles

11.2.2 Patrón o Calibrador:

- Perla calibradoras del equipo Luminex

XII. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS

12.1 Servicios Técnicos:

Mantenimiento preventivo y correctivo de equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos

12.2 Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono/internet

XIII. MUESTRA

13.1. Obtención de la muestra:

- Ver DI PC-PC MAN 05: Obtención por punción venosa.

13/2. Sistema biológico:

- Suero humano.

13.3. Recipiente:

- Tubos vacoutainer sin anticoagulante, para la colección de sangre periférica.
- Tubos de polipropileno de 1.5 mL, para el almacenamiento del suero extraído.

13.4. Conservación y manejo:

Mantener el suero almacenado por un tiempo no mayor a 4 días posterior a la extracción de la muestra.



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

Histocompatibilidad y Criopreservación



XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Para desarrollar el procedimiento de detección de anticuerpos a Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) de clase II, se realizan las siguientes actividades:

14.1 Toma de muestra:

- 14.1.1 Recepción, atención y entrevista de pacientes: ver DI PC-HC INS 03.
- 14.1.2 Extracción de la muestra mediante punción venosa: ver DI PC-PC MAN 05

14.2 Registro de muestra:

- 14.2.1 Registro de muestra.
- 14.2.2 Registrar los nombres del paciente y postulantes en el DI PC-HC REG 28.
- 14.2.3 Registrar los nombres del paciente y postulantes en el formato electrónico Excel PROCESO HLA.

14.3 Detección de anticuerpos:

- 14.3.1 Mezclar bien las perlas agitando suavemente en vórtex o pipeteando hacia arriba y abajo varias veces antes del uso.
- 14.3.2 Incubar en la oscuridad 5 uL de perlas con 20 uL del suero en estudio en cada pocillo de una placa de 96 pocillos durante 30 minutos a 20 25°C con agitación suave.
- 14.3.3 Diluir tampón de lavado 10X en agua destilada para obtener una solución de lavado 1X.
- 14.3.4 Después de la incubación, añadir 150 uL de tampón de lavado 1X a cada pocillo de la placa. Cubrir con cierre para bandeja y agite en un vórtex.
- 14.3.5 Centrifugar a 1.300 g durante 5 minutos.
- 14.3.6 Retirar el tampón de lavado de los pocillos de la placa agitando las bandejas o mediante aspiración por vacío.
- 14.3.7 Añadir 200 uL de tampón de lavado 1X a cada pocillo de la placa. Cubrir la bandeja con un cierre nuevo y agite en un vórtex. Centrifugar a 1.300 g durante 5 minutos.
- 14.3.8 Retirar el sobrenadante de los pocillos de la placa agitando las bandejas o mediante aspiración por vacío.
- 14.3.9 Diluir 1 uL por prueba de anti-lgG humana conjugada con PE 100X con 99 ul de tampón de lavado 1X para preparar una solución 1X.
- 14.3.10 Añadir 100 uL de anti-IgG humana conjugada con PE 1X a cada pocillo. Cubrir con cierre para bandeja y agite en un vórtex. Incubar en la oscuridad durante 30 minutos a 20 25 °C con agitación suave.
- 14.3.11 Centrifugar a 1.300 g durante 5 minutos.
- 14.3.12 Retirar el sobrenadante de los pocillos de la placa agitando las bandejas o mediante aspiración por vacío.
- 14.3.13 Luego de la recepción y validación de los tubos de muestra, se colocarán en los racks respectivos.















Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

14.3.14 Añadir 80 uL de tampón PBS 1X a cada pocillo. Cubrir la bandeja con un cierre nuevo y agite en un vórtex. Proceder a la adquisición y el análisis de los datos o almacene la bandeja a 2 - 8 °C en la oscuridad hasta 24 horas antes del análisis.

14.4 Análisis de resultado:

- 14.4.1 Configurar el citómetro de flujo para la adquisición de muestras y la calibración según se indica en el manual del usuario.
- 14.4.2 Seleccionar una plantilla de acuerdo con el ID del catálogo y el número de lote del kit del producto.
- 14.4.3 Crear un nombre de archivo para las muestras que se analizarán.
- 14.4.4 Asegúrarse de que la configuración de la plantilla sea correcta. Las especificaciones de la plantilla son:
 - Establecer el volumen de la muestra hasta 50 uL.
 - Establecer el tiempo de espera para la muestra en 80 segundos.
 - Establecer la separación del discriminador de doblete en 8.000 (límite inferior) y 16.000 (límite superior).
 - Establezca el número e ID de las perlas seleccionadas de acuerdo con la hoja de trabajo específica proporcionada con el producto.
- 14.4.5 Establecer los sucesos mínimos recopilados en 100 por perla.
- 14.4.6 Ingresar los ID de las muestras (si se analiza la misma muestra más de una vez, deberá asignarse un ID diferente.)
- 14.4.7 Cargar la placa en la plataforma XY.
- 14.4.8 Se debe pulsar el botón START para iniciar la sesión. Después de finalizar el análisis de las muestras, hay que guardar los datos obtenidos en un archivo de tipo .csv.
- 14.4.9 Lavar el analizador dos veces con buffer de lavado, al final de la sesión.

14.5 Almacenamiento de la muestra:

14.5.1 Almacenamiento de muestras: ver DI PC-HC INS 08.

14.6 Elaboración y entrega de resultado:

- 14.6.1 Registrar los resultados en el DI PC-HC REG 28.
- 14.6.2 Registrar los resultados en el formato electrónico excel PROCESO HLA (DI PC HC FOR 18).

⟨V. CONTROL DE LA CALIDAD ANALÍTICA

- **15.1** El citómetro de flujo realiza el análisis de hasta 100 o 500 regiones por cada perla, en una única prueba.
- 15.2 La reactividad de una muestra en estudio se calcula a partir de los valores de fluorescencia "sin procesar" registrados por el dispositivo (archivo.csv) para cada perla recubierta con HLA.
- 15.3 Calcular la reactividad del suero anti-HLA corrigiendo por uniones no específicas a las perlas de control negativo y valores de fondo (obtenidos mediante el análisis del

















Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

Histocompatibilidad y Criopreservación

suero de control negativo), para determinar la relación normalizada de fondo (relación NBG). Véanse los cálculos, a continuación.

Relación NBG = (S#N/PERLASNC) / (BG#N/PERLA BGNC).

- 15.4 Determinación del valor umbral positivo/negativo: seleccione la relación NBG que muestra una desviación significativa sobre el valor de fondo de la fluorescencia cuando el valor de fondo se ha obtenido con el suero de control negativo en pruebas con 3 5 replicados.
- **15.5** Otra opción es analizar 5 10 muestras de suero de donantes varones que no hayan recibido transfusiones ni trasplantes para obtener un valor medio de fondo
- 15.6 Valide el valor umbral utilizando 5 10 muestras de alosuero de referencia con una especificidad de anticuerpos frente al HLA definida. Los valores de la relación NBG de las reacciones positivas previstas de los antígenos deben ser superiores al valor umbral.
- 15.7 Se pueden observar reacciones adicionales positivas o negativas. Si es necesario, ajuste el valor umbral del método para que coincida con la sensibilidad de un método de detección de anticuerpos aceptado previamente.
- **15.8** Para suero de PRA alto, los antígenos propios del paciente pueden demostrar reacciones positivas débiles. En estos casos, el valor de fluorescencia para el antígeno propio del paciente puede utilizarse como valor umbral.
- 15.9 El valor umbral de la señal en relación con el fondo debe validarse si se utiliza un suero de control negativo nuevo.
- **15.10** Para un suero determinado, el valor de PC/NC debe ser superior a 2. Un valor inferior puede deberse a un valor de fondo de la perla del NC extremadamente elevado para el suero en estudio, una señal elevada de las perlas de HLA del control NS o a una señal baja del anticuerpo secundario o del analizador de flujo. En este caso, puede ser necesario confirmar los datos.
- **15.11** Cada usuario debe evaluar el rendimiento del método en su laboratorio para validar el valor umbral seleccionado.
- **15.12** Las muestras de plasma pueden dar valores más bajos de FI o valores más altos de fondo que aquellas de suero. El usuario podría preferir normalizar los datos al comparar resultados entre muestras de suero y plasma para un mismo o para diferentes sujetos de prueba.
- 15.13 Para calcular el porcentaje del PRA (anticuerpo reactivo de un panel), divida el número de reacciones positivas entre el número de reacciones válidas de ese suero en estudio.
- 1/5.14 Para determinar la especificidad del anticuerpo frente al HLA, anote la puntuación de la reacción en la hoja de trabajo específica del lote con el fin de analizar el patrón de la reacción.

XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS

16.1 Rango de valores a informar:

Sub análisis 1: Detección de anticuerpo a antígeno de leucocitos humanos HLA clase II

- Porcentual

















Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación





16.2 Rangos de alarma:

Sub análisis 1: Detección de anticuerpo a antígeno de leucocitos humanos HLA clase II

Porcentual: mayor a 80%

16.3 Intervalos de referencia

Sub análisis 1: Detección de anticuerpo a antígeno de leucocitos humanos HLA clase II

- Porcentual: 0 - 100%



Contro/ N

XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Angaswamy N, Tiriveedhi V, Sarma NJ, Subramanian V, Klein C, Wellen J, et al. (2013). Interplay between immune responses to HLA and non-HLA self-antigens in allograft rejection. Hum Immunol.; 74(11):1478–1485.
- 2. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, van Huyen JP, Mooney N, et al. (2013). Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. N Engl J Med. 369(13):1215–1226.
- 3. Kardduss-Urueta A, Gale RP, Gutierrez-Aguirre CH, Herrera-Rojas MA, Murrieta Álvarez I, Perez-Fontalvo R et al. (2018). Freezing the graft is not necessary for autotransplants for plasma cell myeloma and lymphomas. Bone Marrow Transplant. 53(4):457-460.
- 4. Sarmiento M, Ramírez P, Parody R, Salas MQ, Beffermann N, Jara V et al. (2018). Advantages of non-cryopreserved autologous hematopoietic stem cell transplantation against a cryopreserved strategy. Bone Marrow Transplant. 53(8):960-966.



XVIII. ANEXOS

- Anexo N° 1: Control de Registros
- Anexo N° 2: Control de cambios y mejoras.









Volla

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

Histocompatibilidad y Criopreservación

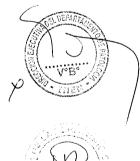
ANEXO N° 1 CONTROL DE REGISTROS



CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	NOMBRE DEL REGISTRO	LUGAR DE ALMACENAMIENTO (TIEMPO) USO / TEMPORAL	RESPONSABLE DE PROTECCIÓN	TIEMPO DE ARCHIVO
DI PC-HC REG 06	MANUALES DE PROCEDIMIENTOS TOMO I	Estante documentario Sector 2 (2 años) / sector de almacenamiento 1 (8 años)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	10 años









INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS





Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de

Histocompatibilidad y Criopreservación

V⁰ I⁰

ANEXO N° 2 CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

Vi Vi			CONTROL DE CAMBIOS	Y MEJORAS	
OE ORGANI	VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
OPE-INEM OPE-INEM OPE-INEM OPE-INEM OPE-INEM OPE-INEM	01	1 - 11	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN). Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.	18/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael







INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA



I. OBJETIVO

Normalizar el procedimiento de Tipificación molecular HLA-A-SSO en resolución intermedia.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS

- Código CPMS (MINSA): 86812.03
- Código Tarifario Institucional: 240109



ALCANCE

El presente documento normativo se emplea para realizar el procedimiento de procedimiento de Tipificación molecular HLA-A-SSO en resolución intermedia, en el Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación del Equipo Funcional de Patología Clínica.



IV. RESPONSABILIDADES

- Médico Patólogo Clínico del área de trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de supervisar el proceso, confirmar análisis y firma de resultados de análisis.
- Biólogo/a del Grupo de Trabajo Extracción del área de trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de realizar el análisis de laboratorio en muestra biológica.
- Personal administrativo del área de trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al procedimiento.



V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

 Ver Manual de Terminología del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).



LINEAMIENTOS

- El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Calidad del Equipo Funcional de Patología Clínica INEN.
- **6.2** El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Bioseguridad del Equipo Funcional de Patología Clínica –INEN.
- **6.3** El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se elabora en base a los instructivos emitidos por el fabricante.
- 6.4 La mezcla de perlas, el buffer de Hibridación y el buffer SAPE son susceptibles a la luz. Mantenerlos en oscuridad.
- 6.5 El buffer SAPE es susceptible a la temperatura, deberá ser almacenado de 80° a 8° C, una vez descongelado debe ser almacenado en un congelador de 2° a 8° C.



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

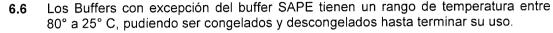
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo

Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

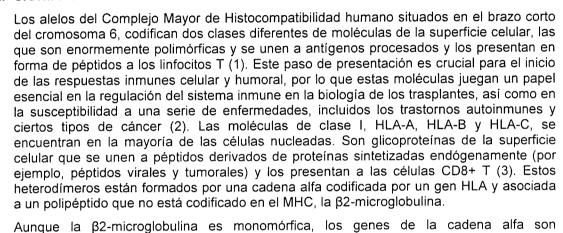






- 6.7 Las perlas son más estables cuando están congeladas y se deben mantener así hasta su uso. Una vez descongelada manténgase a 4° C.
- 6.8 Los sets de primers y el D-mix es más estable a un rango de temperatura de 80° a -20° C, se recomienda este rango de temperatura para su almacenamiento, pudiendo congelarse y descongelarse cada vez para su uso.

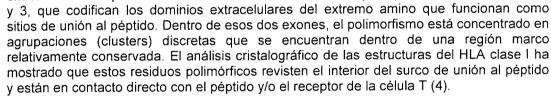
VII. SIGNIFICANCIA CLÍNICA



extremadamente polimórficos. Esta variabilidad se localiza principalmente en los exones 2







VIII. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA

El método de tipificación inversa de ADN mediante reacción en cadena de polimerasa de secuencia especifica de oligonucleótido PCR-SSO, empleando los principios de citometría de flujo. Primero, el ADN de destino se amplifica por PCR utilizando un cebador específico de grupo. El producto de PCR está biotinilado, lo que permite su detección con estreptavidina conjugada con r-ficoeritrina (SAPE) (5).

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 identifica la intensidad de fluorescencia de la PE (ficoeritrina) en cada microesfera. La asignación de la tipificación de HLA se basa en el patrón de reacción comparado con patrones asociados a secuencias de genes HLA publicadas (6).



Cumplir las Normas de Bioseguridad 7.2.4. **Nivel de Bioseguridad 2 (BSL 2):** máxima. Ver Manual de Bioseguridad (DI PC-PC MAN 02).





INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: www.inen.sld.pe e-mail: postmaster@inen.sld.pe

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

ORGA:













X. EQUIPAMIENTO

10.1 Equipos (médico, biomédico, electromecánico, informático):

- Placa para PCR de 96 pocillos
- Placas de tipificación de 96 pocillos para citómetro de flujo LABScanTM 100
- Agitador (Vortex)
- Citómetro de flujo LABScanTM 100 Sistema Luminex 200
- Congeladora eléctrica vertical hasta 80° C
- Microcentrífuga
- Termociclador
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 12000 Btu Tipo Split
- Centrífuga:
 - Rotor para microtubos de 1,5 mL
 - Rotor para microplacas de 96 pocillos
- Computadora personal portátil con pantalla de 14 In
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Monitor plano de 20 In
- Unidad central de proceso CPU de 3.1 Ghz
- Teclado keyboard con puerto USB
- Mouse óptico con puerto USB

10.2 Instrumentales:

- Micropipeta de rango variable 1000 uL 5000 uL
- Micropipeta de rango variable 10 100 uL
- Micropipeta volumen fijo 50 uL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 0.5 uL 10 uL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 10 uL 100 uL
- Gradilla de polipropileno para 96 Tubos de 1.5 mL 2 mL
- Lentes Protectores de policarbonato resistente a golpes y salpicaduras

10.3 Mobiliario:

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Mesa de metal
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Cajonera rodable de malamina

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

10.4 Software:

- Sistema Luminex 200



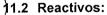
Calidad y Control Nac

WEN-

SUMINISTROS

11.1 Insumos y material:

- Tubo estéril de micro centrífuga (1.5 mL)
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Bota descartable antideslizante
- Gorro descartable unisex x 100 unidades
- Guante para examen descartable talla M x 100 unidades
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Mandil descartable estéril talla estándar tips con filtro 100 µL
- Bolígrafo (lapicero) de tinta líquida punta fina color azul
- Cuaderno empastado rayado tamaño A5 x 200 hojas
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para hp cod. ref. 05x ce505x negro
- Placas microtest PS fondo V
- Tips estéril con filtro 0.1 UI 10 UI x 96
- Tips con filtro 200 UI x 96
- Tips 200 UI x 1000
- Marcador de peso molecular (100Pb Ladder) X 250 μL
- Tips 0.5 UI -10 UI X 500
- Plumón de tinta indeleble punta fina



- Agarosa Grado biología molecular x 500 g
- Buffer Tae 10X Grado biología molecular x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000X X 200 UI
- Agua molecular
- Agua destilada
- Etanol 70%
- Enzima Tag DNA polimerasa recombinante
- Buffer de Denaturación
- Buffer de Neutralización
- Buffer de Hibridación





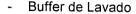
Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: www.inen.sld.pe e-mail: postmaster@inen.sld.pe



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación







- Buffer SAPE
- Kit de tipificación molecular de HLA-A genómico por sec. Oligonucleótidos (SSO) x 20 determinaciones
- Primer set D-mix LOCUS A
- Primer set LOCUS A
- Mezcla de perlas LOCUS A
- R-ficoeritrina-estreptidina conjugada SAPE
- Reactivo SYBR SAFE P/Tinción de elctroforesis ADN en gel agarosa 10 X
- Enzima Taq DNA polimerasa recombinante (5 U/UI) x 75 UI
- PCR Tray
- PE Conjugated streptavidin liofilizado



- Perla de calibración LX200 CALIBRATION KIT
- Sheat fluid 20L

11.2.2 Patrón o calibrador:

- Perlas de control LX200 VERIFICATION KIT



XII. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS

12.1 Servicios Técnicos:

Mantenimiento preventivo y correctivo de equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos

12.2 Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono/Internet

XIII. MUESTRA

13.1. Obtención de la muestra:

- Ver DI PC-PC MAN 05: Obtención por punción venosa.

13.2. Sistema biológico:

- ADN.

13.3. Recipiente:

Tubo cónico 1.5 mL.









Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo

Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

13.4. Conservación y manejo:

- Mantener el ADN a temperaturas en un rango entre -20 y -30°C, para su mejor conservación.

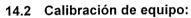


XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Para desarrollar el procedimiento para la tipificación molecular HLA-A-SSO en resolución intermedia, se realizan las siguientes actividades:



14.1.1 Según DI PC INS 03.



- 14.2.1 Dar click en la pestaña MAINTENANCE para ingresar a la pantalla mantenimiento, luego dar click en AUTO MAINT.
- 14.2.2 Seleccionar SYSTEM CALIBRATION.
- 14.2.3 Dar click en EJECT y se abrirá la compuerta del equipo, colocar la placa blanca, administrar los calibradores.
- 14.2.4 Dar click en EJECT para cerrar la compuerta.
- 14.2.5 Dar click en RUN para iniciar la rutina.



14.3.1 Según DI PC INS 06 AMPLIFICACIÓN.

14.4 Separación mediante electroforesis

14.4.1 Según DI PC INS 17

14.5 Tipificación molecular genes HLA:

14.5.1 Preparación de equipo y reactivos – configuración de la prueba:

- a) Fijarse en la **Tabla Nº 1** para los volúmenes de reactivos necesitados según el número de muestras.
- b) Programe el termociclador para una temperatura definida a 60°C. Durante la incubación, recuerde sellar la placa de PCR, utilice una almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa.
- c) Alícuotas de Buffer de Desnaturalización (DB), Buffer de Neutralización (NB), Buffer de Hibridación (HB) deben ser almacenado a temperatura ambiente antes de su uso inmediato.
- d) Combine la cantidad apropiada Mezcla de perlas (BM) LOCUS A, con la cantidad específica de Buffer de hibridación (HB) para preparar la Mezcla de perlas y el Buffer de hibridación (HBM). Esto se hace inmediatamente siguiendo la neutralización de la muestra.
- e) Alícuotar el volumen apropiado de Buffer de SAPE (SB) según la Tabla N° 2 "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE". Recuerde de guardar los reactivos no usados a 4 °C. Prepare 1X SAPE Solución (SSB) según la **Tabla N° 2** "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE". No mezclar hasta la tercera centrifugación. La Reserva de SAPE (SS) está a 100X, removerla solo cuando sea necesario y retornar inmediatamente a una temperatura entre 2° y 8°C.











Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

Tabla Nº 1: Volúmenes de reactivos

	Volumenes de alí	Almacenar a 4 °C			
Cantidad Muestra	Buffer de Desnaturalización (DB) uL	Buffer de Neutralización (NB) uL	Buffer de Hibridación (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
96	240	480	3264	46080	384

Fuente: Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación. Equipo Funcional de Patología Clinica.

Tabla N° 2: Volúmenes de SAPE y BUFFER SAPE

Cantidad Pruebas	SAPE reserva (SS) uL	Buffer de SAPE (SB) uL
Cantidad Pruebas 1 5	0.5	49.5
5	2.5	247.5
10	5.0	495.0
20	10.0	990.0
50	25.0	2475.0
96	48.0	4752.0

Fuente: Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación. Equipo Funcional de Patología Clínica.

14.5.2 Desnaturalización/Neutralización

- f) Prepare un baño con hielo molido.
- g) Coloque una placa de 96 pocillos limpia en un soporte.
- h) Transfiere 5 uL de cada muestra de DNA amplificado en un pocillo limpio de una placa de 96 pocillos. Asegúrese que la ubicación y la identificación sean anotadas.
- i) Adicionar 2.5 uL de Buffer de Desnaturalización (DB), mezclar e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- j) Adicionar 5 uL de Buffer de Neutralización (NB) con una pipeta y mezclar fuertemente (preferentemente con succión y descarga arriba y abajo con la pipeta). Note el cambio de color de rosa hacia amarillo pálido o claro.
- k) Coloque la placa de producto de neutralización en un baño de hielo.
 Evite la contaminación del producto PCR con agua.



Control Na





Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

14.5.3 Hibridación

Nota: Asegúrese que el termociclador ha sido prendido y el programa de 60 °C ha comenzado a calentar el bloque.

- a) Combine volúmenes apropiados de Mezcla de Perlas (BM) LOCUS A, Buffer de Hibridación (HB), vórtice. Consulte la tabla.
- b) Adicionar 38 uL de mezcla del buffer de hibridación y perlas a cada pocillo.
- c) Quite la placa del baño de hielo, cubra la placa con el sello, y vórtice.
- d) 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.
- e) Coloque la placa en el soporte, quite el sello de la placa y rápidamente añada 100 uL de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugue la placa por 5 minutos entre 1000 1300 g.
- f) Recuerde preparar 1X SAPE Solución (SSB) durante la tercera centrifugación. Consulte la Tabla N° 2 "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE".

14.5.4 Identificación

- a) Coloque la placa en el soporte; añadir 50uL 1X SAPE Solución (SSB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa y vórtice. Coloque la placa de PCR en el termociclador (60°C) pre calentado, utilice una almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa, incubar por 5 minutos.
- b) Saque la placa, y colóquela en el soporte, quite el sello de la placa, y rápidamente añada 100 uL de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugue la placa por 5 minutos entre 1000 -1300 g, colocar en el sostenedor de la bandeja y eliminar el buffer de lavado.
- c) Adicionar 70 uL del Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, mezcle con cuidado y traslade a la placa para leer usando una pipeta multicanal de 8 o 12 canales. El volumen final deberá ser de al menos 80ul.
- d) Cubra la placa con sello de placa y papel de aluminio. Mantenga en la oscuridad y a temperatura de 4°C hasta colocarla en el LabScanTM100 para leer.
- e) Para mejores resultados, leer las muestras lo más antes posible. El almacenamiento prolongado de las muestras (más de 4 horas) puede resultar en pérdida de marcaje.

14.5.5 Leyendo muestras

- a) Llene el Sheath Fluid envase y asegure bien el tapón.
- b) Después que la máquina pase por pre-calentamiento, siga con preparación y afluir con alcohol. Si es necesario calibrar con gotas de calibración, seguido por 4 lavados obligatorios.
- c) Seleccione el icono plantilla (TEMPLATE) y seleccione la mezcla de gotas que será usada. Verifique el número de lote seleccionado.



















Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

- d) Seleccione el icono SETTINGS para asignar el número de muestras que serán probadas, el volumen de la muestra debe estar a 50 µL y los eventos a 100 por cada gota.
- e) Anote las identificaciones de cada muestra.
- f) Una vez terminado, subrayar el "analyzer menu". PRIME, cuando la operación este completa subrayar la primera muestra para indicar dónde empezar. Es recomendable que la primera muestra sea interpretada como muestra sola (escoja icono START) para verificar que las muestras estén interpretando adecuadamente. Por ejemplo, verificando la presencia de aire y que la presión de la máquina este correcta.
- g) Seleccione el icono START el tiempo de interpretación varíe entre 10 segundos a 1.5 minutos dependiendo del número de gotas. Si la primera muestra lee correctamente, pueden rechazar el "Single Setting".
- h) Cuando la máquina cumple leyendo la muestra, avanzar a la próxima muestra y continuar automáticamente completando las muestras restantes.
- i) Cuando haya terminado con la última muestra, escoja el icono SAVE.

14.5.6 Cerrando la máquina

- a) Lave 2X con sheath fluid, desinfecte (Sanitize) 1X con 20% lejía, lavar 3X con agua DI y remoje (Soak) con agua DI.
- b) La máquina puede ser cerrada y afloje el tapón de la botella del sheath fluid.

14.6 Análisis y elaboración del Informe HLA

- 14.6.1 El personal asistencial con ayuda del software de recopilación de datos o equivalente realiza el análisis respectivo.
- 14.6.2 Se redacta el informe de los resultados HLA.
- 14.6.3 La validación es realizada el Médico Patólogo encargado del Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación.
- 14.6.4 El personal asistencial elabora el informe final con la descripción de los hallazgos y particularidades de la prueba realizada.

CONTROL DE LA CALIDAD ANALÍTICA

er Procedimiento de Gestión de Calidad Analítica y Procedimiento de Mantenimiento de Equipos del Sistema de Gestión de la Calidad de Patología Clínica.

XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS

16.1 Rango de valores a informar:

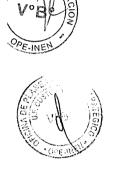
Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-A- SSO en resolución intermedia

Texto

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-A- SSO en resolución intermedia

- Texto, Describir hallazgos particulares de la prueba realizada.
- Indicar de requerimiento de nueva muestra.

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS















Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



16.2 Rangos de alarma:

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-A- SSO en resolución intermedia

- Numérico: No aplica
- Alfabético: No aplica

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-A-SSO en resolución intermedia

- Texto: No aplica

16.3 Intervalos de referencia:

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-A-SSO en resolución intermedia

- Numérico: No aplica
- Alfabético: No aplica

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-A-SSO en resolución intermedia

Texto: No aplica



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beck, S., Geraghty, D., Inoko, H., & Rowen, L. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. Rev. Nature. 1999. Vol. 401. N° 6756. pg 921-923.
- Delorson, K. (s.f.). Capítulo 3 El Complejo Mayor de Histocompatibilidad. 2. Histocompatibilidad e Inmunogenética. United Kingdom. Disponible en ebook: http://www.histocompatibilidad-e-inmunogenetica.com//nomenclatura-hla/
- Echeverría Velásquez, M. Análisis de la asociación entre alelos HLA clase II y 3. leucemia en población mestiza venezolana. Potenciales implicaciones patogénicas. Alcalá de Henares, 2012.
- Jones, Y. E., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. MHC Class II proteins and disease: a structural perspective. Nature Reviews Inmunology, 2006.271-282.
 - Neefjes, J., Jongsma, M. L., Paul, P., & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nature Reviews Inmunology, 2011, 11, 823-836.
- Software HLA Fusion™ v. 2.x. Manual del Usuario Software HLA FusionTM. ONE 6. LAMBDA INC. 2010.

XVIII. ANEXOS

- Anexo N° 1: Control de registros.
- Anexo N° 2: Control de cambios y mejoras.







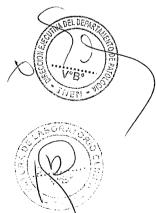
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

ANEXO Nº 1

CONTROL DE REGISTROS

DE ORGANIZATION DE ORGANIZATIO	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	NOMBRE DEL REGISTRO	LUGAR DE ALMACENAMIENTO (TIEMPO) USO / TEMPORAL	RESPONSABLE DE PROTECCIÓN	TIEMPO DE ARCHIVO
AMIENTO SE	DI PC-HC REG 06	MANUALES DE PROCEDIMIENTOS TOMO I	Estante documentario Sector 5 (1 año) / sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años
Camad A Cours, Mach	DI PC-HC REG 31	REGISTRO DE PLACA DE TIPIFICACIÓN	Estante documentos Sector 6 (1 año) / Sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años
(0)	~\~\				











Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo

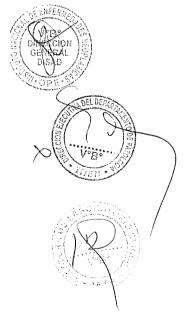
Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



ANEXO N° 2

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

OE ORGAN		CONTROL DE CAMBIOS	MEJORAS	
WERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
OPE-INITIAL DE LA CONTROL MACCONTROL MACCONT	1 - 12	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN). Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.	18/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael





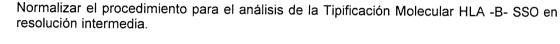


Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA

I. OBJETIVO





- Código CPMS (MINSA): 86812.04
- Código Tarifario INEN: 240110



III. ALCANCE

El presente documento normativo se emplea para la Tipificación Molecular HLA -B- SSO en resolución intermedia, en el Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación del Equipo Funcional de Patología Clínica.

IV. RESPONSABILIDADES

- Senicios Official Senicios Sen
- Médico Patólogo Clínico del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de supervisar el proceso, confirmar análisis y firmar resultados de análisis.
- Biólogo/a del Grupo de Trabajo Análisis, del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de realizar el análisis de laboratorio en muestra biológica.
- Personal administrativo del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al procedimiento.

V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

 Ver Manual de Terminología del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).

LINEAMIENTOS

- 6.1 El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Calidad del Equipo Funcional de Patología Clínica –INEN.
- **6.2** El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Bioseguridad del Equipo Funcional de Patología Clínica INEN.
- **6.3** El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se elabora en base a los instructivos emitidos por el fabricante.
- **6.4** La mezcla de perlas, el buffer de Hibridación y el buffer SAPE son susceptibles a la luz. Mantenerlos en oscuridad.
- **6.5** El buffer SAPE es susceptible a la temperatura, deberá ser almacenado de -80° a 8°C, una vez descongelado debe ser almacenado en un congelador de 2° a 8° C.
- 6.6 Los buffers con excepción del buffer SAPE tienen un rango de temperatura entre -80° a 25° C, pudiendo ser congelados y descongelados hasta terminar su uso.







Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



- 6.7 Las perlas son más estables cuando están congeladas y se deben mantener así hasta su uso. Una vez descongelada manténgase a 4 °C.
- 6.8 Los sets de primers y el D-mix es más estable a un rango de temperatura de -80° a -20° C, se recomienda este rango de temperatura para su almacenamiento, pudiendo congelarse y descongelarse cada vez para su uso.



VII. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Los alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano situados en el brazo corto del cromosoma 6, codifican dos clases diferentes de moléculas de la superficie celular, las que son enormemente polimórficas y se unen a antígenos procesados y los presentan en forma de péptidos a los linfocitos T (1). Este paso de presentación es crucial para el inicio de las respuestas inmunes celular y humoral, por lo que estas moléculas juegan un papel esencial en la regulación del sistema inmune en la biología de los trasplantes, así como en la susceptibilidad a una serie de enfermedades, incluidos los trastornos autoinmunes y ciertos tipos de cáncer (2). Las moléculas de clase I, HLA-A, HLA-B y HLA-C, se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Son glicoproteínas de la superficie celular que se unen a péptidos derivados de proteínas sintetizadas endógenamente (por ejemplo, péptidos virales y tumorales) y los presentan a las células CD8+ T (3). Estos heterodímeros están formados por una cadena alfa codificada por un gen HLA y asociada a un polipéptido que no está codificado en el MHC, la β2-microglobulina.



Aunque la 62-microglobulina es monomórfica, los genes de la cadena alfa son extremadamente polimórficos. Esta variabilidad se localiza principalmente en los exones 2 y 3, que codifican los dominios extracelulares del extremo amino que funcionan como sitios de unión al péptido. Dentro de esos dos exones, el polimorfismo está concentrado en agrupaciones (clusters) discretas que se encuentran dentro de una región marco relativamente conservada. El análisis cristalográfico de las estructuras del HLA clase I ha mostrado que estos residuos polimórficos revisten el interior del surco de unión al péptido y están en contacto directo con el péptido y/o el receptor de la célula T (4).



VIII. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA

El método de tipificación inversa de ADN mediante reacción en cadena de polimerasa de secuencia especifica de oligonucleótido PCR-SSO, empleando los principios de citometría Primero, el ADN de destino se amplifica por PCR utilizando un cebador específico de grupo. El producto de PCR está biotinilado, lo que permite su detección con estreptavidina conjugada con r-ficoeritrina (SAPE) (5).



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 identifica la intensidad de fluorescencia de la PE (ficoeritrina) en cada microesfera. La asignación de la tipificación de HLA se basa en el patrón de reacción comparado con patrones asociados a secuencias de genes HLA publicadas (6).



SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES MEDIOAMBIENTALES

Cumplir las Normas de Bioseguridad 7.2.3. Nivel de Bioseguridad 2 (BSL 2): Máxima, Ver Manual de Bioseguridad (DI PC-PC MAN 02).

EQUIPAMIENTO



- 10.1 Equipos (médico, biomédico, electromecánico, informático):
 - Placa para PCR de 96 pocillos
 - Placas de tipificación de 96 pocillos para citómetro de flujo LABScanTM 100

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: www.inen.sld.pe e-mail: postmaster@inen.sld.pe



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

- Agitador (Vortex)
- Citómetro de flujo LABScanTM 100 Sistema Luminex 200
- Congeladora eléctrica vertical hasta -80° C
- Computadora personal portátil con pantalla de 14 In
- Microcentrifuga
- Termociclador
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 12000 Btu tipo split
- Termociclador
- Centrifuga:
 - Rotor para microtubos de 1,5 mL
 - Rotor para microplacas de 96 pocillos
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20 In
- Unidad central de proceso CPU de 3.1 Ghz
- Teclado keyboard con puerto USB
- Mouse óptico con puerto USB

10.2 Instrumentales:

- Micropipeta volúmen variable 1000 uL 5000 uL
- Micropipeta volúmen variable 10 100 uL
- Micropipeta volúmen fijo 50 uL
- Micropipeta de 8 canales volúmen variable 0.5 uL 10 uL
 - Micropipeta de 8 canales volúmen variable 10 100 uL
 - Gradilla de polipropileno para 96 tubos de 1.5 mL 2 mL (Cja X 4)
- Lentes protectores de policarbonato resistente a golpes y salpicaduras

10.3 Mobiliario:

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal



Control Na

NEN





Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo

Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

10.4 Software:

Sistema Luminex 200

XI. SUMINISTROS



11.1 Insumos y material:

- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Bota descartable antideslizante
- Gorro descartable unisex x 100 unidades
- Guante para examen descartable talla M x 100 unidades
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Mandil descartable estéril talla estándar tips con filtro 100 uL
- Boligrafo (lapicero) de tinta líquida punta fina color azul
- Cuaderno empastado rayado tamaño A5 x 200 hojas
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para HP cod. ref. 05x ce505 x negro
- Placas microtest PS fondo V
- Tips estéril con filtro 0.1 uL 10 uL x 96
- Tips con filtro 200 uL x 96
- Tips 200 uL x 1000
- Marcador de peso molecular (100Pb Ladder) X 250 uL
- Tips 0.5 uL -10 uL x 500
- Plumón de tinta indeleble punta fina

11.2 Reactivos:

- Aqua molecular
- Agua destilada
- Etanol 70%
- Buffer de nenaturación
- Buffer de neutralización
- Buffer de hibridación
- Buffer de lavado
- Buffer SAPE
- Primer set D-mix LOCUS B
- Primer set LOCUS B
- Mezcla de perlas LOCUS B



Control Nan





Taq polimerasa



PNT.DNCC.INEN.124. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA V.01

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación













- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer Tae 10X grado biología molecular x 1 L

R-ficoeritrina-estreptidina conjugada SAPE

- Colorante para ácidos nucleicos (DNA) en gel de agarosa 10 000X x 200 uL
- **PCR Tray**
- PE Conjugated streptavidin liofilizado
- Kit de tipificación molecular de HLA-A- genómico por sec. Oligonucleótidos (SSO) x 20 determinaciones
- Reactivo SYBR SAFE P/Tinción de electroforesis ADN en gel agarosa 10X

11.2.1 Materiales de control:

- Perla de calibración LX200 CALIBRATION KIT
- Sheat fluid 20 L

11.2.2 Patrón o calibrador

Perlas de control LX200 VERIFICATION KIT

XII. MUESTRA

12.1. Obtención de la muestra:

- Ver DI PC-PC MAN 05: Obtención por punción venosa.

12.2. Sistema biológico:

- ADN.

12.3. Recipiente:

- Tubo cónico 1.5 mL.

12.4. Conservación y manejo:

Mantener el ADN a temperaturas en un rango entre -20 y -30°C, para su mejor conservación.

XIII. SERVIÇIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS

13.1 Servicios Técnicos:

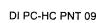
Mantenimiento preventivo y correctivo de equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos

13.2 Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono/Internet







Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Para desarrollar el procedimiento para tipificación molecular HLA-B-SSO en resolución intermedia, se realizan las siguientes actividades:



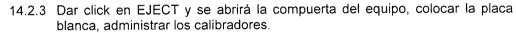
14.1 Recepción, registro y almacenamiento de DNA:

14.1.1 Ver DI PC-HC INS 03.

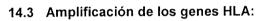


14.2 Calibración equipo:

- 14.2.1 Dar click en la pestaña MAINTENANCE para ingresar a la pantalla mantenimiento, luego dar click en AUTO MAINT.
- 14.2.2 Seleccionar SYSTEM CALIBRATION



- 14.2.4 Dar click en EJECT para cerrar la compuerta.
- 14.2.5 Dar click en RUN para iniciar la rutina.

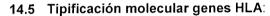


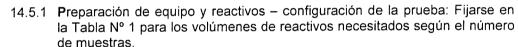
14.3.1 Según DI PC INS 06 AMPLIFICACIÓN.

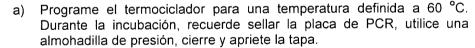


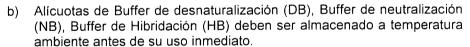
14.4 Separación mediante electroforesis:

14.4.1 Según DI PC INS 17.









- Combine la cantidad apropiada Mezcla de perlas (BM) LOCUS B, con la cantidad específica de Buffer de hibridación (HB) para preparar la Mezcla de perlas y el Buffer de hibridación (HBM). Esto se hace inmediatamente siguiendo la neutralización de la muestra.
- Alícuotar el volumen apropiado de Buffer de SAPE (SB) según la Tabla N° 2 "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE". Recuerde de guardar los reactivos no usados a 4 °C. Prepare 1X SAPE Solución (SSB) según la Tabla N° 2 "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE". No mezclar hasta la tercera centrifugación. La Reserva de SAPE (SS) está a 100X, removerla solo cuando sea necesario y retornar inmediatamente a una temperatura entre 2° y 8 °C.











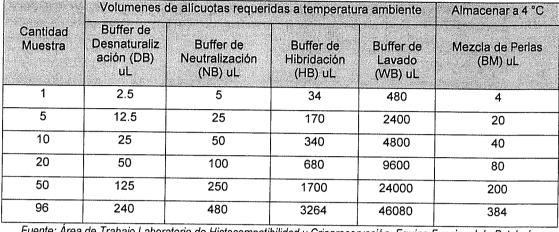


Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación











Fuente: Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación. Equipo Funcional de Patología Clínica



Tabla N° 2: Volúmenes de SAPE y BUFFER SAPE

Cantidad Pruebas	SAPE reserva (SS) uL	Buffer de SAPE (SB) uL
1	0.5	49.5
5	2.5	247.5
10	5.0	495.0
20	10.0	990.0
50	25.0	2475.0
96	48.0	4752.0

Fuente: Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación. Equipo Funcional de Patología Clínica



- Prepare un baño con hielo molido.
- b) Coloque una placa de 96 pocillos limpia en un soporte.
- Transfiere 5 uL de cada muestra de DNA amplificado en un pocillo limpio de una placa de 96 pocillos. Asegúrese que la ubicación y la identificación sean anotadas.
- d) Adicionar 2.5 uL de Buffer de Desnaturalización (DB), mezclar e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 5 uL de Buffer de Neutralización (NB) con una pipeta y mezclar fuertemente (preferentemente con succión y descarga arriba y abajo con la pipeta). Note el cambio de color de rosa hacia amarillo pálido o claro.
- Coloque la placa de producto de neutralización en un baño de hielo. Evite la contaminación del producto PCR con agua.



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS







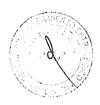
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo

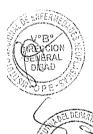
Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

OE ORGAN













14.5.3 Hibridación:

Nota: Asegúrese que el termociclador ha sido prendido y el programa de 60°C ha comenzado a calentar el bloque.

- a) Combine volúmenes apropiados de Mezcla de perlas (BM) LOCUS B, Buffer de hibridación (HB), vórtice. Consulte la tabla.
- Adicionar 38 uL de mezcla del buffer de hibridación y perlas a cada pocillo.
- c) Quite la placa del baño de hielo, cubra la placa con el sello, y vórtice.
- d) 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.
- e) Coloque la placa en el soporte, quite el sello de la placa y rápidamente añada 100 UI de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugue la placa por 5 minutos entre 1000 1300 g.
- f) Recuerde preparar 1X SAPE Solución (SSB) durante la tercera centrifugación. Consulte la Tabla N° 2 "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE".

14.5.4 Identificación:

- a) Coloque la placa en el soporte; añadir 50 uL 1X SAPE Solución (SSB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa y vórtice. Coloque la placa de PCR en el termociclador (60° C) pre calentado, utilice una almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa, incubar por 5 minutos.
- Saque la placa, y colóquela en el soporte, quite el sello de la placa, y rápidamente añada 100 uL de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugue la placa por 5 minutos entre 1000 - 1300 g, colocar en el sostenedor de la bandeja y eliminar el buffer de lavado.
- c) Adicionar 70 uL del Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, mezcle con cuidado y traslade a la placa para leer usando una pipeta multicanal de 8 o 12 canales. El volumen final deberá ser de al menos 80 uL.
- d) Cubra la placa con sello de placa y papel de aluminio. Mantenga en la oscuridad y a temperatura de 4 °C hasta colocarla en el LabScanTM100 para leer.
- e) Para mejores resultados, leer las muestras lo más antes posible. El almacenamiento prolongado de las muestras (más de 4 horas) puede resultar en pérdida de marcaje.

14.5.5 Leyendo muestras:

- a) Llene el Sheath Fluid envase y asegure bien el tapón.
- b) Después que la máquina pase por pre-calentamiento, siga con preparación y afluir con alcohol. Si es necesario calibrar con gotas de calibración, seguido por 4 lavados obligatorios.
- c) Seleccione el icono plantilla (TEMPLATE) y seleccione la mezcla de gotas que será usada. Verifique el número de lote seleccionado.

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: www.inen.sld.pe e-mail: postmaster@inen.sld.pe



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación









- Seleccione el icono SETTINGS para asignar el número de muestras que serán probadas, el volumen de la muestra debe estar a 50 uL y los eventos a 100 por cada gota.
- Anote las identificaciones de cada muestra.
- Una vez terminado, subrayar el "analyzer menu". PRIME, cuando la operación este completa subrayar la primera muestra para indicar donde empezar. Es recomendable que la primera muestra sea interpretada como muestra sola (escoja icono START) para verificar que las muestras estén interpretando adecuadamente. Por ejemplo, verificando la presencia de aire y que la presión de la máquina este correcta.
- g) Seleccione el icono START el tiempo de interpretación varíe entre 10 segundos a 1.5 minutos dependiendo del número de gotas. Si la primera muestra lee correctamente, pueden rechazar el "Single Setting".
- Cuando la máquina cumple leyendo la muestra, avanzará a la próxima muestra y continuará automáticamente completando las muestras restantes.
- Cuando haya terminado con la última muestra, escoja el icono SAVE.

14.5.6 Cerrando la máquina:

- Lave 2X con sheath fluid, desinfecte (Sanitize) 1X con 20% lejía, lavar 3X con agua DI y remoje (Soak) con agua DI.
- La máquina puede ser cerrada y afloje el tapón de la botella del sheath fluid.

14.6 Análisis y elaboración del Informe HLA

- 14.6.1 El personal asistencial con ayuda del software de recopilación de datos o equivalente realiza el análisis respectivo.
- 14.6.2 Se redacta el informe de los resultados HLA.
- 14.6.3 La validación es realizada el Médico Patólogo encargado del Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación.
- 14.6.4 El personal asistencial elabora el informe final con la descripción de los hallazgos y particularidades de la prueba realizada.

XV. CONTROL DE LA CALIDAD ANALÍTICA

Ver Procedimiento de Gestión de Calidad Analítica y ver Procedimiento de Mantenimiento de Equipos del Sistema de Gestión de la Calidad de Patología Clínica.

XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS

16.1 Rango de valores a informar:

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA - B- SSO en resolución intermedia

Texto

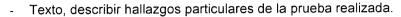
Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA - B - SSO en resolución intermedia

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS





Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabaio Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



Indicar de requerimiento de nueva muestra.

16.2 Rangos de alarma:

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA - B- SSO en resolución intermedia

Numérico: No aplica

Alfabético: No aplica

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA - B - SSO en resolución

intermedia

Texto: No aplica

16.3 Intervalos de referencia:

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA - B- SSO en resolución intermedia

Numérico: No aplica

Alfabético: No aplica

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA - B - SSO en resolución intermedia

Texto: No aplica

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beck, S., Geraghty, D., Inoko, H., & Rowen, L. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. Rev. Nature. 1999. Vol. 401. N° 6756. pg 921-923.
- Delorson, K. (s.f.). Capítulo 3 El Complejo Mayor de Histocompatibilidad. 2. Histocompatibilidad e Inmunogenética. United Kingdom. Disponible en ebook: http://www.histocompatibilidad-e-inmunogenetica.com//nomenclatura-hla/
- Echeverría Velásquez, M. Análisis de la asociación entre alelos HLA clase II y leucemia en población mestiza venezolana. Potenciales implicaciones patogénicas. Alcalá de Henares. 2012.
- Jones, Y. E., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. MHC Class II proteins and 4. disease: a structural perspective. Nature Reviews Inmunology, 2006.271-282.
- Neefjes, J., Jongsma, M. L., Paul, P., & Bakke, O. Towards a systems 5. understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nature Reviews Inmunology. 2011. 11. 823-836.
- Software HLA Fusion™ v. 2.x. Manual del Usuario Software HLA FusionTM. ONE LAMBDA INC. 2010.

XVIII. ANEXOS

- Anexo N° 1: Control de registros
- Anexo N° 2: Control de cambios y mejoras.



Calidad y Control Nac







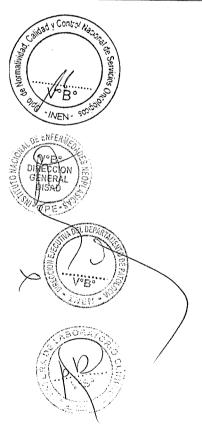




Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

ANEXO N° 1 CONTROL DE REGISTROS

Ζ,					
1 ACION	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	NOMBRE DEL REGISTRO	LUGAR DE ALMACENAMIENTO (TIEMPO) USO / TEMPORAL	RESPONSABLE DE PROTECCIÓN	TIEMPO DE ARCHIVO
	DI PC-HC REG 06	MANUALES DE PROCEDIMIENTOS TOMO I	Estante documentario Sector 5 (1 años) / sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años
A TESTOS	DI PC-HC REG 31	REGISTRO DE PLACA DE TIPIFICACIÓN	Estante documentos Sector 6 (1 años) / Sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años











Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo

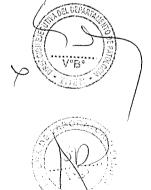
Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



ANEXO N° 2 CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

	CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS					
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)		
Control Nacion	1 - 12	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN). Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.	18/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael		





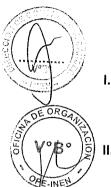


il instituto Nacional de . Entermedades Neoplásic:



PNT.DNCC.INEN.125. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA V.01

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo
Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA

. OBJETIVO

Normalizar el procedimiento para el análisis de Tipificación Molecular HLA-C-SSO en resolución intermedia.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS

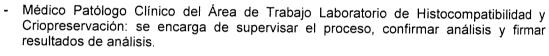
- Código CPMS (MINSA): 86812.05
- Código Tarifario INEN: 240111

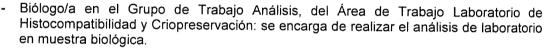


III. ALCANCE

El presente documento normativo se emplea para la Tipificación Molecular HLA-C-SSO en resolución intermedia, en el Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación del Equipo Funcional de Patología Clínica.

IV. RESPONSABILIDADES





 Personal administrativo del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al procedimiento.



 Ver Manual de Terminología del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).

LINEAMIENTOS

- 6.1 Èl presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Calidad del Equipo Funcional de Patología Clínica –INEN.
- 6.2 El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Bioseguridad del Equipo Funcional de Patología Clínica INEN.
- **6.3** El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se elabora en base a los instructivos emitidos por el fabricante.
- **6.4** La mezcla de perlas, el buffer de Hibridación y el buffer SAPE son susceptibles a la luz. Mantenerlos en oscuridad.
- **6.5** El buffer SAPE es susceptible a la temperatura, deberá ser almacenado de -80° a 8°C, una vez descongelado debe ser almacenado en un congelador de 2° a 8 °C.
- 6.6 Los buffers con excepción del buffer SAPE tienen un rango de temperatura entre -80° a 25 °C, pudiendo ser congelados y descongelados hasta terminar su uso.











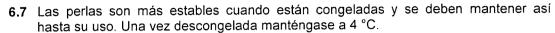




Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo

Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



6.8 Los sets de primers y el D-mix es más estable a un rango de temperatura de -80° a - 20 °C, se recomienda este rango de temperatura para su almacenamiento, pudiendo congelarse y descongelarse cada vez para su uso.

SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Los alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano situados en el brazo corto del cromosoma 6, codifican dos clases diferentes de moléculas de la superficie celular, las que son enormemente polimórficas y se unen a antígenos procesados y los presentan en forma de péptidos a los linfocitos T (1). Este paso de presentación es crucial para el inicio de las respuestas inmunes celular y humoral, por lo que estas moléculas juegan un papel esencial en la regulación del sistema inmune en la biología de los trasplantes, así como en la susceptibilidad a una serie de enfermedades, incluidos los trastornos autoinmunes y ciertos tipos de cáncer (2). Las moléculas de clase I, HLA-A, HLA-B y HLA-C, se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Son glicoproteínas de la superficie celular que se unen a péptidos derivados de proteínas sintetizadas endógenamente (por ejemplo, péptidos virales y tumorales) y los presentan a las células CD8+ T (3). Estos heterodímeros están formados por una cadena alfa codificada por un gen HLA y asociada a un polipéptido que no está codificado en el MHC, la β2-microglobulina.

Aunque la β2-microglobulina es monomórfica, los genes de la cadena alfa son extremadamente polimórficos. Esta variabilidad se localiza principalmente en los exones 2 y 3, que codifican los dominios extracelulares del extremo amino que funcionan como sitios de unión al péptido. Dentro de esos dos exones, el polimorfismo está concentrado en agrupaciones (clusters) discretas que se encuentran dentro de una región marco relativamente conservada. El análisis cristalográfico de las estructuras del HLA clase I ha mostrado que estos residuos polimórficos revisten el interior del surco de unión al péptido y están en contacto directo con el péptido y/o el receptor de la célula T (4).

VIII. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA

El método de tipificación inversa de ADN mediante reacción en cadena de polimerasa de secuencia especifica de oligonucleótido PCR-SSO, empleando los principios de citometría de flujo. Primero, el ADN de destino se amplifica por PCR utilizando un cebador específico de grupo. El producto de PCR está biotinilado, lo que permite su detección con estreptavidina conjugada con r-ficoeritrina (SAPE) (5).

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 identifica la intensidad de fluorescencia de la PE (ficoeritrina) en cada microesfera. La asignación de la tipificación de HLA se basa en el patrón de reacción comparado con patrones asociados a secuencias de genes HLA publicadas (6).

(. SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES MEDIOAMBIENTALES

Cumplir con las Normas de Bioseguridad 7.2.3. Nivel de Bioseguridad 2(BSL 29: Máxima, Ver Manual de Bioseguridad (DI PC-PC MAN 02).

X. EQUIPAMIENTO

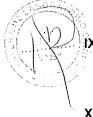
- 10.1 Equipos (médico, biomédico, electromecánico, informático):
 - Placa para PCR de 96 pocillos
 - Placas de tipificación de 96 pocillos para citómetro de flujo LABScanTM 100

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS















Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



Yad A Coura, Va

- Agitador (Vortex)
- Citómetro de flujo LABScanTM 100 Sistema Luminex 200
- Congeladora eléctrica vertical hasta -80° C
- Computadora personal portátil con pantalla de 14 In
- Microcentrífuga
- Termociclador
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 12000 Btu tipo split
- Centrifuga:
 - Rotor para microtubos de 1,5 mL
 - Rotor para microplacas de 96 pocillos
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20 In
- Unidad central de proceso CPU de 3.1 Ghz
- Teclado keyboard con puerto USB
- Mouse óptico con puerto USB



10.2 Instrumentales:

- Micropipeta volúmen variable 1000 uL 5000 uL
- Micropipeta volúmen variable 10 100 uL
- Micropipeta volúmen fijo 50 uL
- Micropipeta de 8 canales volúmen variable 0.5 uL 10 uL
- Micropipeta de 8 canales volúmen variable 10 uL- 100 uL
- Gradilla de polipropileno para 96 tubos de 1.5 mL 2 mL (Cja X 4)
 - Lentes protectores de policarbonato resistente a golpes y salpicaduras



10.3 Mobiliario:

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Mesa de metal
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Cajonera rodable de malamina

10.4 Software:

Sistema Luminex 200







Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

SUMINISTROS XI.

11.1 Insumos y material:

- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Bota descartable antideslizante
- Gorro descartable unisex x 100 unidades
- Guante para examen descartable talla M x 100 unidades
- Mascarilla descartable quirurgica 3 pliegues
- Mandil descartable estéril talla estándar tips con filtro 100 uL
- Bolígrafo (lapicero) de tinta líquida punta fina color azuL
- Cuaderno empastado rayado tamaño A5 X 200 hojas
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para hp cod. ref. 05x ce505x negro
- Placas microtest PS fondo V
- Tips estéril con filtro 0.1 uL 10 uL x 96
- Tips con filtro 200 uL x 96
- Tips 200 uL x 1000
- Marcador de peso molecular (100Pb Ladder) X 250 uL
- Tips 0.5 uL -10 uL x 500
- Plumón de tinta indeleble punta fina



ady Control N

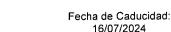
11.2 Reactivos:

- Agua molecular
- Agua destilada
- Etanol 70%
- Buffer de denaturación
- Buffer de neutralización
- Buffer de hibridación
- Buffer de lavado
- **Buffer SAPE**
- Primer set D-mix LOCUS C
- Primer set LOCUS C
- Mezcla de perlas LOCUS C
- R-ficoeritrina-estreptidina conjugada SAPE
- Taq polimerasa
- Agarosa grado biología molecular x 500 g











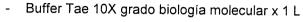






Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación





- Colorante para ácidos nucleicos (DNA) en gel de agarosa 10 000X x 200 uL
- PCR Tray
- PE Conjugated streptavidin liofilizado
- Kit de tipificación molecular de HLA-C-Genómico por sec. Oligonucleótidos (SSO) x 20 determinaciones
- Reactivo SYBR SAFE P/Tinción de lectroforesis ADN en gel agarosa 10X



- Perla de calibración LX200 CALIBRATION KIT
- Sheat fluid 20 L



- Perlas de control LX200 VERIFICATION KIT



12.1 Servicios Técnicos:

Mantenimiento preventivo y correctivo de equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos

12.2 Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono/Internet

NII. MUESTRA

13.1. Obtención de la muestra:

- Ver DI PC-PC MAN 05: Obtención por punción venosa.

13.2. Sistema biológico:

- ADN.

13.3. Recipiente:

- Tubo cónico 1.5 mL.

13.4. Conservación y manejo:

 Mantener el ADN a temperaturas en un rango entre -20 y -30°C, para su mejor conservación.









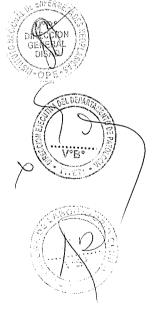




Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación









XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Para desarrollar el procedimiento para la tipificación molecular HLA-C-SSO en resolución intermedia, se realizan las siguientes actividades:

- 14.1 Recepción, registro y almacenamiento de DNA:
 - Ver DI PC-HC INS 03. 14,1.1
- 14.2 Calibración de equipo:
 - Dar click en la pestaña MAINTENANCE para ingresar a la pantalla 14.2.1 mantenimiento, luego dar click en AUTO MAINT.
 - 14.2.2 Seleccionar SYSTEM CALIBRATION.
 - Dar click en EJECT y se abrirá la compuerta del equipo, colocar la placa 14.2.3 blanca, administrar los calibradores.
 - Dar click en EJECT para cerrar la compuerta. 14.2.4
 - Dar click en RUN para iniciar la rutina. 14.2.5
- 14.3 Amplificación de los genes HLA:
 - Según DI PC INS 06 AMPLIFICACIÓN. 14.3.1
- 14.4 Separación mediante electroforesis:
 - Según DI PC INS 17. 14.4.1
- 14.5 Tipificación molecular genes HLA:
 - 14.5.1 Preparación de equipo y reactivos configuración de la prueba: Fijarse en la Tabla Nº 1 para los volúmenes de reactivos necesitados según el número de muestras.
 - Programe el termociclador para una temperatura definida a 60°C. Durante la incubación, recuerde sellar la placa 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 almacenado a temperatura ambiente antes de su uso inmediato.
 - Combine la cantidad apropiada Mezcla de perlas (BM) LOCUS B, con la cantidad específica de Buffer de hibridación (HB) para preparar la Mezcla de perlas y el Buffer de hibridación (HBM). Esto se hace inmediatamente siguiendo la neutralización de la muestra.
 - Alícuotar el volumen apropiado de Buffer de SAPE (SB) según la Tabla N° 2 "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE". Recuerde de guardar los reactivos no usados a 4 °C. Prepare 1X SAPE Solución (SSB) según la Tabla N° 2 "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE". No mezclar hasta la tercera centrifugación. La Reserva de SAPE (SS) está a 100X, removerla solo cuando sea necesario y retornar inmediatamente a una temperatura entre 2° y 8 °C.





Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo
Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

Tabla Nº 1: Volúmenes de reactivos

Cantidad Muestra	Volumenes de a	Almacenar a 4 °C			
	Buffer de Desnaturalización (DB) uL	Buffer de Neutralización (NB) uL	Buffer de Hibridación (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
96	240	480	3264	46080	384

Fuente: Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación. Equipo Funcional de Patología Clínica.

Tabla N° 2: Volúmenes de SAPE y BUFFER SAPE

ç∖ Cantidad Pruebas	SAPE reserva (SS) uL	Buffer de SAPE (SB) uL
Cantidad Pruebas	0.5	49.5
5	2.5	247.5
10	5.0	495.0
20	10.0	990.0
50	25.0	2475.0
96	48.0	4752.0

Fuente: Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación. Equipo Funcional de Patología Clínica.



14.5.2 Desnaturalización / neutralización:

- a) Prepare un baño con hielo molido.
- b) Coloque una placa de 96 pocillos limpia en un soporte.
- c) Transfiere 5 uL de cada muestra de DNA amplificado en un pocillo limpio de una placa de 96 pocillos. Asegúrese que la ubicación y la identificación sean anotadas.
- d) Adicionar 2.5 uL de Buffer de desnaturalización (DB), mezclar e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- e) Adicionar 5 uL de Buffer de neutralización (NB) con una pipeta y mezclar fuertemente (preferentemente con succión y descarga arriba y abajo con la pipeta). Note el cambio de color de rosa hacia amarillo pálido o claro.
- f) Coloque la placa de producto de neutralización en un baño de hielo. Evite la contaminación del producto PCR con agua.



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

14.5.3 Hibridación:

Nota: Asegúrese que el termociclador ha sido prendido y el programa de 60°C ha comenzado a calentar el bloque.

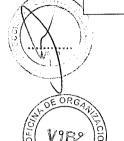
- Combine volúmenes apropiados de Mezcla de perlas (BM) LOCUS B. Buffer de hibridación (HB), vórtice. Consulte la tabla.
- Adicionar 38 uL de mezcla del buffer de hibridación y perlas a cada pocillo.
- Quite la placa del baño de hielo, cubra la placa con el sello, y vórtice.
- Quite la placa del soporte y colóquela en el termociclador (60 °C) pre calentado, utilice una almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa, incubar por 15 minutos.
- Coloque la placa en el soporte, quite el sello de la placa y rápidamente añada 100 uL de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugue la placa por 5 minutos entre 1000 - 1300 g.
- Recuerde preparar 1X SAPE Solución (SSB) durante la tercera centrifugación. Consulte la Tabla N° 2 "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE".

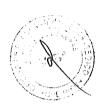
14.5.4 Identificación:

- Coloque la placa en el soporte; añadir 50uL 1X SAPE Solución (SSB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa y vórtice. Coloque la placa de PCR en el termociclador (60 °C) pre calentado, utilice una almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa, incubar por 5 minutos.
- Saque la placa, y colóquela en el soporte, quite el sello de la placa, y rápidamente añada 100 uL de Buffer de lavado (WB) a cada pocillo, v cubra con sello la placa. Centrifugue la placa por 5 minutos entre 1000 - 1300 g, colocar en el sostenedor de la bandeja y eliminar el buffer de lavado.
- Adicionar 70 uL del Buffer de lavado (WB) a cada pocillo, mezcle con cuidado y traslade a la placa para leer usando una pipeta multicanal de 8 o 12 canales. El volumen final deberá ser de al menos 80 uL.
- Cubra la placa con sello de placa y papel de aluminio. Mantenga en la oscuridad y a temperatura de 4 °C hasta colocarla en el LabScanTM100 para leer.
- Para mejores resultados, leer las muestras lo más antes posible. El almacenamiento prolongado de las muestras (más de 4 horas) puede resultar en pérdida de marcaje.

14.5.5 Levendo muestras:

- Llene el Sheath Fluid envase y asegure bien el tapón.
- Después que la máquina pase por pre-calentamiento, siga con preparación y afluir con alcohol. Si es necesario calibrar con gotas de calibración, seguido por 4 lavados obligatorios.
- Seleccione el icono plantilla (TEMPLATE) y seleccione la mezcla de gotas que será usada. Verifique el número de lote seleccionado.































Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

- Seleccione el icono SETTINGS para asignar el número de muestras que serán probadas, el volumen de la muestra debe estar a 50 uL y los eventos a 100 por cada gota.
- Anote las identificaciones de cada muestra.
- Una vez terminado, subrayar el "analyzer menu". PRIME, cuando la operación este completa subrayar la primera muestra para indicar dónde empezar. Es recomendable que la primera muestra sea interpretada como muestra sola (escoja icono START) para verificar que las muestras estén interpretando adecuadamente. Por ejemplo, verificando la presencia de aire y que la presión de la máquina este correcta.
- Seleccione el icono START el tiempo de interpretación varíe entre 10 segundos a 1.5 minutos dependiendo del número de gotas. Si la primera muestra lee correctamente, pueden rechazar el "Single Settina".
- Cuando la máquina cumple leyendo la muestra, avanzará a la próxima muestra y continuará automáticamente completando las muestras restantes.
- Cuando haya terminado con la última muestra, escoja el icono SAVE.

14.5.6 Cerrando la máquina:

- Lave 2X con sheath fluid, desinfecte (Sanitize) 1X con 20% lejía, lavar 3X con agua DI y remoje (Soak) con agua DI.
- La máquina puede ser cerrada y afloje el tapón de la botella del sheath fluid.

14.6 Análisis y elaboración del Informe HLA

- 14.6.1 El personal asistencial con ayuda del software de recopilación de datos o equivalente realiza el análisis respectivo.
- 14.6.2 Se redacta el informe de los resultados HLA.
- 14.6.3 La validación es realizada el Médico Patólogo encargado del Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación.
- El personal asistencial elabora el informe final con la descripción de los hallazgos y particularidades de la prueba realizada.

XV. CONTROL DE LA CALIDAD ANALÍTICA

Ver Procedimiento de Gestión de Calidad Analítica y Procedimiento de Mantenimiento de Equipos del Sistema de Gestión de la Calidad de Patología Clínica.

XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS

16.1 Rango de valores a informar:

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA -C- SSO en resolución intermedia

Texto

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-C-SSO en resolución intermedia

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS









Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo

Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



- Indicar de requerimiento de nueva muestra.

16.2 Rangos de alarma:

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-C- SSO en resolución intermedia

- Numérico: No aplica

- Alfabético: No aplica

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-C- SSO en resolución intermedia

- Texto: No aplica

16.3 Intervalos de referencia:

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-C- SSO en resolución intermedia

- Numérico: No aplica

- Alfabético: No aplica

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-C- SSO en resolución intermedia

- Texto: No aplica

I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Beck, S., Geraghty, D., Inoko, H., & Rowen, L. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. Rev. Nature. 1999. Vol. 401. N° 6756. pg 921-923.
- 2. Delorson, K. (s.f.). Capítulo 3 El Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Histocompatibilidad e Inmunogenética. United Kingdom. Disponible en ebook: http://www.histocompatibilidad-e-inmunogenetica.com//nomenclatura-hla/
- 3. Echeverría Velásquez, M. Análisis de la asociación entre alelos HLA clase II y leucemia en población mestiza venezolana. Potenciales implicaciones patogénicas. Alcalá de Henares. 2012.
- Jones, Y. E., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. MHC Class II proteins and disease: a structural perspective. Nature Reviews Inmunology, 2006.271-282.
- 5. Neefjes, J., Jongsma, M. L., Paul, P., & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nature Reviews Inmunology. 2011. 11. 823-836.
- 6. Software HLA Fusion™ v. 2.x. Manual del Usuario Software HLA FusionTM. ONE LAMBDA INC. 2010.

XVIII. ANEXOS

- Anexo N° 1: Control de registros
- Anexo N° 2: Control de cambios y mejoras.











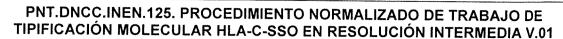












Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



ANEXO Nº 1

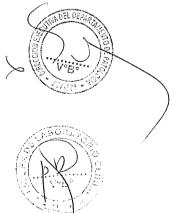
CONTROL DE REGISTROS



)	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	NOMBRE DEL REGISTRO	LUGAR DE ALMACENAMIENTO (TIEMPO) USO / TEMPORAL	RESPONSABLE DE PROTECCIÓN	TIEMPO DE ARCHIVO
	DI PC-HC REG 06	MANUALES DE PROCEDIMIENTOS TOMO I	Estante documentario Sector 5 (1 años) / sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años
1851	DI PC-HC REG 31	REGISTRO DE PLACA DE TIPIFICACIÓN	Estante documentos Sector 6 (1 años) / Sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años











ύ Sectol Salud



PNT.DNCC.INEN.125. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA V.01

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

ANEXO N° 2

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

OF ORGAN	5)	CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS					
PPE-INET	VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)		
Colled y Control A	01	1 - 12	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN). Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.	18/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael		













Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA



I. **OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento para el análisis de Tipificación Molecular HLA-DR-SSO en resolución intermedia.

11. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS

- Código CPMS (MINSA): 86816.01
- Código Tarifario INEN: 240112



ALCANCE

El presente documento normativo se emplea para la Tipificación Molecular HLA-DR-SSO en resolución intermedia, en el Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación del Equipo Funcional de Patología Clínica.

IV. RESPONSABILIDADES



- Médico Patólogo Clínico del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de supervisar el proceso, confirmar análisis y firma de resultados de análisis.
- Biólogo/a del Grupo de Trabajo Análisis, del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de realizar el análisis de laboratorio en muestra biológica.
- Personal administrativo del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al procedimiento.

DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

Ver Manual de Terminología del Sistema de Gestión de la Calidad - SGC de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).

LINEAMIENTOS

- El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Calidad del Equipo Funcional de Patología Clínica -INEN.
- 6.2 El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Bioseguridad del Equipo Funcional de Patología Clínica -INEN.
- El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se elabora en base a los instructivos emitidos por el fabricante.
- 6.4 La mezcla de perlas, el buffer de Hibridación y el buffer SAPE son susceptibles a la luz. Mantenerlos en oscuridad.
- 6.5 El buffer SAPE es susceptible a la temperatura, deberá ser almacenado de -80° a 8°C, una vez descongelado debe ser almacenado en un congelador de 2° a 8 °C.
- 6.6 Los buffers con excepción del buffer SAPE tienen un rango de temperatura entre -80° a 25 °C, pudiendo ser congelados y descongelados hasta terminar su uso.

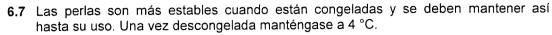


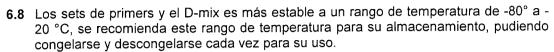




Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo
Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación









VII. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Los alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano situados en el brazo corto del cromosoma 6, codifican dos clases diferentes de moléculas de la superficie celular, las que son enormemente polimórficas y se unen a antígenos procesados y los presentan en forma de péptidos a los linfocitos T (1). Este paso de presentación es crucial para el inicio de las respuestas inmunes celular y humoral, por lo que estas moléculas juegan un papel esencial en la regulación del sistema inmune en la biología de los trasplantes, así como en la susceptibilidad a una serie de enfermedades, incluidos los trastornos autoinmunes y ciertos tipos de cáncer (2). Las moléculas de clase I, HLA-A, HLA-B y HLA-C, se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Son glicoproteínas de la superficie celular que se unen a péptidos derivados de proteínas sintetizadas endógenamente (por ejemplo, péptidos virales y tumorales) y los presentan a las células CD8+ T (3). Estos heterodímeros están formados por una cadena alfa codificada por un gen HLA y asociada a un polipéptido que no está codificado en el MHC, la β2-microglobulina.



Aunque la β2-microglobulina es monomórfica, los genes de la cadena alfa son extremadamente polimórficos. Esta variabilidad se localiza principalmente en los exones 2 y 3, que codifican los dominios extracelulares del extremo amino que funcionan como sitios de unión al péptido. Dentro de esos dos exones, el polimorfismo está concentrado en agrupaciones (clusters) discretas que se encuentran dentro de una región marco relativamente conservada. El análisis cristalográfico de las estructuras del HLA clase I ha mostrado que estos residuos polimórficos revisten el interior del surco de unión al péptido y están en contacto directo con el péptido y/o el receptor de la célula T (4).



VIII. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA

El método de tipificación inversa de ADN mediante reacción en cadena de polimerasa de secuencia especifica de oligonucleótido PCR-SSO, empleando los principios de citometría de flujo. Primero, el ADN de destino se amplifica por PCR utilizando un cebador específico de grupo. El producto de PCR está biotinilado, lo que permite su detección con estreptavidina conjugada con r-ficoeritrina (SAPE) (5).



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 identifica la intensidad de fluorescencia de la PE (ficoeritrina) en cada microesfera. La asignación de la tipificación de HLA se basa en el patrón de reacción comparado con patrones asociados a secuencias de genes HLA publicadas (6).



SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES MEDIOAMBIENTALES

Cumplir las Normas de Bioseguridad 7.2.3. Nivel de Bioseguridad 2 (BSL 2): Máxima, Ver Manual de Bioseguridad (DI PC-PC MAN 02).



C. EQUIPAMIENTO

10.1 Equipos (médico, biomédico, electromecánico, informático):

- Placa para PCR de 96 pocillos
- Placas de tipificación de 96 pocillos para citómetro de flujo LABScanTM 100

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS



Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación















Agitador (Vortex)

Silin

- Citómetro de flujo LABScanTM 100 Sistema Luminex 200
- Congeladora eléctrica vertical hasta -80° C
- Computadora personal portátil con pantalla de 14 In
- Microcentrífuga
- Termociclador
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 12000 Btu tipo Split
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo
- Centrifuga:
 - Rotor para microtubos de 1,5 mL
 - Rotor para microplacas de 96 pocillos
- Computadora personal portátil con pantalla de 14 In
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Monitor plano de 20 In
- Unidad central de proceso CPU de 3.1 Ghz
- Teclado keyboard con puerto USB
- Mouse óptico con puerto USB

10.2 Instrumentales:

- Micropipeta volumen variable 1000 uL 5000 uL
- Micropipeta volumen variable 10 uL 100 uL
- Micropipeta volumen fijo 50 uL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 0.5 uL 10 uL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 10 100 uL
- Gradilla de polipropileno para 96 tubos de 1.5 mL 2 mL (Cja X 4)
 - Lentes protectores de policarbonato resistente a golpes y salpicaduras

10.3 Mobiliario:

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Mesa de metal.
- Estante de melamina
- Cajonera rodable de malamina

10.4 Software:

Sistema Luminex 200







PERÚ





PNT.DNCC.INEN.126. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA V.01

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo

Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



Nady Control Nac

XI. SUMINISTROS

11.1 Insumos y material:

- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Bota descartable antideslizante
- Gorro descartable unisex x 100 unidades
- Guante para examen descartable talla M x 100 unidades
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Mandil descartable estéril talla estándar tips con filtro 100 uL
- Bolígrafo (lapicero) de tinta líquida punta fina color azul
- Cuaderno empastado rayado tamaño A5 x 200 hojas
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para HP cód. ref. 05x ce505x negro
- Placas microtest PS fondo V
- Tips estéril con filtro 0.1 uL 10 uL x 96
- Tips con filtro 200 uL x 96
- Tips 200 uL x 1000
- Marcador de peso molecular (100Pb Ladder) X 250 uL
- Tips 0.5 uL -10 uL x 500
- Plumón de tinta indeleble punta fina

11.2 Reactivos:

- Agua molecular
- Agua destilada
- Etanol 70%
- Buffer de denaturación
- Buffer de neutralización
- Buffer de hibridación
- Buffer de lavado
- Buffer SAPE
- Primer set D-mix LOCUS DR
- Primer set LOCUS DR
- Mezcla de perlas LOCUS DR
- R-ficoeritrina-estreptidina conjugada SAPE
- Taq polimerasa







Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer Tae 10X grado biología molecular x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (DNA) en gel de agarosa 10 000X x 200 uL
- Kit de tipificación molecular de HLA-DR-genómico por sec. Oligonucleótidos (SSO) x 20 determinaciones
- PCR Tray
- PE Conjugated streptavidin liofilizado
- Reactivo SYBR SAFE P/T inción de electroforesis ADN en gel agarosa 10X



- Perla de calibración LX200 CALIBRATION KIT
- Sheat fluid 20 L

11.2.2 Patrón o calibrador

- Perlas de control LX200 VERIFICATION KIT



Calibad y Control 1/2 XII. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS

12.1 Servicios Técnicos:

Mantenimiento preventivo y correctivo de equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos

12.2 Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono/Internet

KIII. MUESTRA

13.1.) Obtención de la muestra:

- Ver DI PC-PC MAN 05: Obtención por punción venosa.

13.2. Sistema biológico:

- ADN.

13.3. Recipiente:

- Tubo cónico 1.5 ml.

13.4. Conservación y manejo:

 Mantener el ADN a temperaturas en un rango entre -20 y -30°C, para su mejor conservación.





Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabaio Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

- 14.1 Recepción, registro y almacenamiento de DNA
 - Ver DI PC-HC INS 03.

14.2 Calibración de equipo

- Dar click en la pestaña MAINTENANCE para ingresar a la pantalla 14.2.1 mantenimiento, luego dar click en AUTO MAINT.
- Seleccionar SYSTEM CALIBRATION. 14.2.2
- Dar click en EJECT y se abrirá la compuerta del equipo, colocar la placa 14.2.3 blanca, administrar los calibradores.
- Dar click en EJECT para cerrar la compuerta. 14.2.4
- 14.2.5 Dar click en RUN para iniciar la rutina.

14.3 Amplificación de los genes HLA

Según DI PC INS 06 AMPLIFICACIÓN. 14.3.1



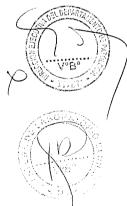
Según DI PC INS 17. 14.4.1



- Preparación de equipo y reactivos configuración de la prueba: Fijarse en la Tabla Nº 1 para los volúmenes de reactivos necesitados según el número de muestras.
 - Programe el termociclador para una temperatura definida a 60 °C. a) Durante la incubación, recuerde sellar la placa de PCR, utilice una almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa.
 - Alícuotar de Buffer de desnaturalización (DB), Buffer de neutralización (NB), Buffer de hibridación (HB) deben ser almacenado a temperatura ambiente antes de su uso inmediato.
 - Combine la cantidad apropiada Mezcla de perlas (BM) LOCUS DR, con la cantidad específica de Buffer de hibridación (HB) para preparar la Mezcla de perlas y el Buffer de hibridación (HBM). Esto se hace inmediatamente siguiendo la neutralización de la muestra.
 - Alícuotar el volumen apropiado de Buffer de SAPE (SB) según la Tabla N° 2 "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE". Recuerde de guardar los reactivos no usados a 4°C. Prepare 1X SAPE Solución (SSB) según la Tabla N° 2 "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE". No mezclar hasta la tercera centrifugación. La Reserva de SAPE (SS) está a 100X. removerla solo cuando sea necesario y retornar inmediatamente a una temperatura entre 2° y 8 °C.







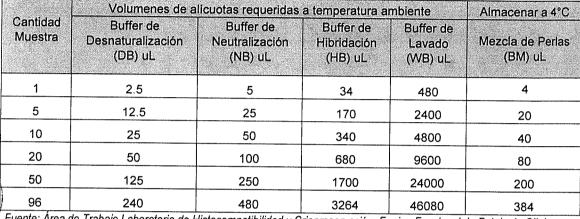




Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



DE ORGANIZACIONI	
to Vore	
OPE-INEN	



Fuente: Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación. Equipo Funcional de Patología Clínica.



Tabla N° 2: Volúmenes de SAPE y BUFFER SAPE

Cantidad Pruebas	SAPE reserva (SS) uL	Buffer de SAPE (SB) uL
1 5	0.5	49.5
5	2.5	247.5
10	5.0	495.0
20	10.0	990.0
50	25.0	2475.0
96	48.0	4752 0

Fuente: Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación. Equipo Funcional de Patología Clínica.



14.5.2 Desnaturalización / neutralización:

- a) Prepare un baño con hielo molido.
- b) Coloque una placa de 96 pocillos limpia en un soporte.
- c) Transfiere 5 uL de cada muestra de DNA amplificado en un pocillo limpio de una placa de 96 pocillos. Asegúrese que la ubicación y la identificación sean anotadas.
- d) Adicionar 2.5 uL de Buffer de Desnaturalización (DB), mezclar e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- e) Adicionar 5 uL de Buffer de Neutralización (NB) con una pipeta y mezclar fuertemente (preferentemente con succión y descarga arriba y abajo con la pipeta). Note el cambio de color de rosa hacia amarillo pálido o claro.
- f) Coloque la placa de producto de neutralización en un baño de hielo. Evite la contaminación del producto PCR con agua.



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS





Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo

Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

14.5.3 Hibridación:

Nota: Asegúrese que el termociclador ha sido prendido y el programa de 60 °C ha comenzado a calentar el bloque.

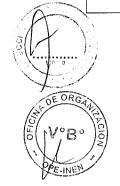
- a) Combine volúmenes apropiados de Mezcla de Perlas (BM) LOCUS DR, Buffer de Hibridación (HB), vórtice. Consulte la tabla.
- b) Adicionar 38 ul. de mezcla del buffer de hibridación y perlas a cada pocillo.
- c) Quite la placa del baño de hielo, cubra la placa con el sello, y vórtice.
- d) Quite la 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.
- e) Coloque la placa en el soporte, quite el sello de la placa y rápidamente añada 100 uL de Buffer de lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugue la placa por 5 minutos entre 1000 1300 g.
- f) Repetir el paso 12.8.5. dos veces más por un total de 3 lavados. Recuerde preparar 1X SAPE Solución (SSB) durante la tercera centrifugación. Consulte la Tabla N° 2 "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE".

14.5.4 Identificación:

- a) Coloque la placa en el soporte; añadir 50ul. 1X SAPE Solución (SSB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa y vórtice. Coloque la placa de PCR en el termociclador (60 °C) pre calentado, utilice una almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa, incubar por 5 minutos.
- Saque la placa, y colóquela en el soporte, quite el sello de la placa, y rápidamente añada 100 uL de Buffer de lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugue la placa por 5 minutos entre 1000 - 1300 g, colocar en el sostenedor de la bandeja y eliminar el buffer de lavado.
- c) Adicionar 70 uL del Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, mezcle con cuidado y traslade a la placa para leer usando una pipeta multicanal de 8 o 12 canales. El volumen final deberá ser de al menos 80 uL.
- d) Cubra la placa con sello de placa y papel de aluminio. Mantenga en la oscuridad y a temperatura de 4°C hasta colocarla en el LabScanTM100 para leer.
- e) Para mejores resultados, leer las muestras lo más antes posible. El almacenamiento prolongado de las muestras (más de 4 horas) puede resultar en pérdida de marcaje.

14.5.5 Leyendo muestras:

- a) Llene el Sheath Fluid envase y asegure bien el tapón.
- b) Después que la máquina pase por pre-calentamiento, siga con preparación y afluir con alcohol. Si es necesario calibrar con gotas de calibración, seguido por 4 lavados obligatorios.
- Seleccione el icono plantilla (TEMPLATE) y seleccione la mezcla de gotas que será usada. Verifique el número de lote seleccionado.







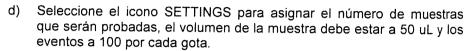








Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



- e) Anote las identificaciones de cada muestra.
- f) Una vez terminado, subrayar el "analyzer menu". PRIME, cuando la operación este completa subrayar la primera muestra para indicar dónde empezar. Es recomendable que la primera muestra sea interpretada como muestra sola (escoja icono START) para verificar que las muestras estén interpretando adecuadamente. Por ejemplo, verificando la presencia de aire y que la presión de la máquina este correcta.
- g) Seleccione el icono START el tiempo de interpretación varíe entre 10 segundos a 1.5 minutos dependiendo del número de gotas. Si la primera muestra lee correctamente, pueden rechazar el "Single Setting".
- h) Cuando la máquina cumple leyendo la muestra, avanzará a la próxima muestra y continuará automáticamente completando las muestras restantes.
- i) Cuando haya terminado con la última muestra, escoja el icono SAVE.

14.5.6 Cerrando la máquina:

- Lave 2X con sheath fluid, desinfecte (Sanitize) 1X con 20% lejía, lavar 3X con agua DI y remoje (Soak) con agua DI.
- b) La máquina puede ser cerrada y afloje el tapón de la botella del sheath fluid.

14.6 Análisis y elaboración del Informe HLA

- 14.6.1 El personal asistencial con ayuda del software de recopilación de datos o equivalente realiza el análisis respectivo.
- 14.6.2 Se redacta el informe de los resultados HLA.
- 14.6.3 La validación es realizada el Médico Patólogo encargado del Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación.
- 14.6.4 El personal asistencial elabora el informe final con la descripción de los hallazgos y particularidades de la prueba realizada.

XV. CONTROL DE LA CALIDAD ANALÍTICA

 Ver Procedimiento de Gestión de Calidad Analítica y Procedimiento de Mantenimiento de Equipos del Sistema de Gestión de la Calidad de Patología Clínica.

XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS

16.1 Rango de valores a informar:

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-DR- SSO en resolución intermedia

Texto

<u>Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-DR-SSO en resolución intermedia</u>



Califad y Control Na

MEN.





Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



- Texto, describir hallazgos particulares de la prueba realizada.
- Indicar de requerimiento de nueva muestra.



16.2 Rangos de alarma:

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-DR- SSO en resolución intermedia

- Numérico: No aplica
- Alfabético: No aplica

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-DR-SSO en resolución intermedia

Texto: No aplica



Intervalos de referencia: 16.3

Sub análisis 1: tipificación molecular HLA-DR- SSO en resolución intermedia

- Numérico: No aplica
- Alfabético: No aplica

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-DR-SSO en resolución intermedia

Texto: No aplica



XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beck, S., Geraghty, D., Inoko, H., & Rowen, L. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. Rev. Nature. 1999. Vol. 401. N° 6756. pg 921-923.
- Delorson, K. (s.f.). Capítulo 3 El Complejo Mayor de Histocompatibilidad. 2. Histocompatibilidad e Inmunogenética. United Kingdom Disponible en ebook: http://www.histocompatibilidad-e-inmunogenetica.com//nomenclatura-hla/
- Echeverría Velásquez, M. Análisis de la asociación entre alelos HLA clase II y leucemia en población mestiza venezolana. Potenciales implicaciones patogénicas. Alcalá de Henares. 2012.
- Jones, Y. E., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. MHC Class II proteins and disease: a structural perspective. Nature Reviews Inmunology, 2006.271-282.
- Neefjes, J., Jongsma, M. L., Paul, P., & Bakke, O. Towards a systems 5. understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nature Reviews Inmunology, 2011, 11, 823-836.
- Software HLA Fusion™ v. 2.x. Manual del Usuario Software HLA FusionTM. ONE LAMBDA INC. 2010.

XVIII. ANEXOS

- Anexo N° 1: Control de registros
- Anexo N° 2: Control de cambios y mejoras.





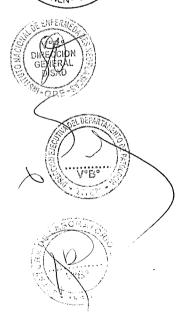
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación



ANEXO Nº 1

CONTROL DE REGISTROS

DE ORGANITA CION	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	NOMBRE DEL REGISTRO	LUGAR DE ALMACENAMIENTO (TIEMPO) USO / TEMPORAL	RESPONSABLE DE PROTECCIÓN	TIEMPO DE ARCHIVO
OPE-INEM	DI PC-HC REG 06	MANUALES DE PROCEDIMIENTOS TOMO I	Estante documentario Sector 5 (1 años) / sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años
Califad y Cantrol Nacy	DI PC-HC REG 31	REGISTRO DE PLACA DE TIPIFICACIÓN	Estante documentos Sector 6 (1 años) / Sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años
a 1.	/ % /				







PERÚ





PNT.DNCC.INEN.126. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA V.01

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

ANEXO N° 2

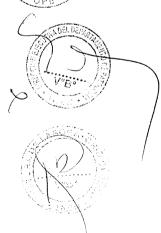
CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS						
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)		
01	1 - 12	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN). Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.	18/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael		



Control Nac







Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: www.inen.sld.pe e-mail: postmaster@inen.sld.pe