

## REPUBLICA DEL PERU



## RESOLUCION JEFATURAL

Lima, 11 de SETIEMBRE de 2020

## VISTOS:

El Informe N° 0285-2020-DICON/INEN, de la Dirección de Control de Cáncer, el Memorando N° 890-2020-OGPP/INEN de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto y el Informe N° 0644-2020-OAJ/INEN de la Oficina de Asesoría Jurídica; y,

## CONSIDERANDO:

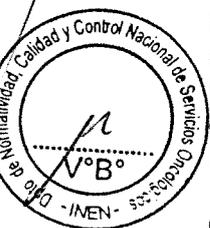
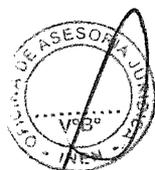
Que a través de la Ley N° 28748, se creó como Organismo Público Descentralizado al Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas - INEN, con personería jurídica de derecho público interno, con autonomía económica, financiera, administrativa y normativa, adscrito al Sector Salud, constituyendo Pliego 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 N° 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° 285-2020-DICON/INEN, la Dirección de Control de Cáncer, remite el Memorando N° 890-2020-OGPP/INEN, de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto, con el cual alcanza los Informes N° 139-2020-OO-OGPP/INEN elaborado por la Oficina de Organización y el Informe N° 826-2020-OPE-OGPP/INEN elaborado por la Oficina de Planeamiento Estratégico, mediante el cual emiten opinión favorable con respecto al Anteproyecto de Procedimiento Normalizado de Trabajo del Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo. Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación;

Que, de la revisión efectuada del Documento Normativo en cuestión elaborado por el Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación - Equipo Funcional. de Patología Clínica - 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 los Procedimientos Normalizados de Trabajo - Área de Trabajo





Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación - Tomo II (08 PNTs), 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 del 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;

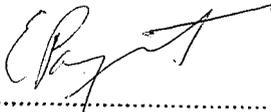
**SE RESUELVE:**

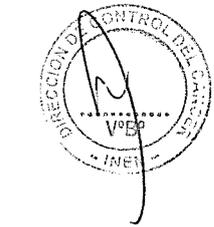
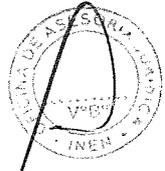
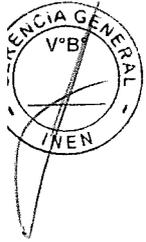
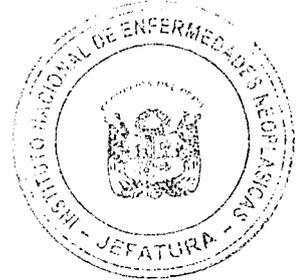
**ARTÍCULO PRIMERO.- APROBAR** el Documento Técnico siguiente, que en anexo forma parte integrante de la presente resolución.

- Procedimientos Normalizados de Trabajo - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación - Tomo II (08 PNTs)

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

**REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y PUBLÍQUESE.**

  
Dr. EDUARDO PAYET MEZA  
Jefe Institucional  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS





**PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO**  
**ÁREA DE TRABAJO**  
**LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y**  
**CRIOPRESERVACIÓN**

**TOMO II (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



<b>Elaborado por:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- M.C. Roxana Regalado Rafael</li> <li>- Btja. Claudia Morales Reyes</li> </ul>	Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación. Equipo Funcional de Patología Clínica.
<b>Revisado y validado por:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lic. Angel Winston Riquez Quispe</li> <li>- Mg. Christian Pino Melliz</li> <li>- Lic. Alexander Massa Villario</li> </ul>	Oficina de Organización
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mg. Piyo Félix Celestino Lázaro</li> <li>- Lic. Angélica Mogollon Monteverde</li> </ul>	Oficina de Planeamiento Estratégico Unidad Funcional de Costos y Tarifas
<b>Revisado y aprobado por:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- M.C. Iván Belzusarri Padilla</li> <li>- Lic. Yoseline Aznarán Isla</li> </ul>	Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos



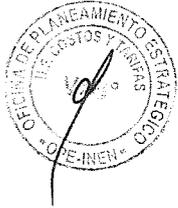
CONTENIDO



1. PNT.DNCC.INEN. 143. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DQ-SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA. V 0.1.



2. PNT.DNCC.INEN. 144. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN. V 0.1.



3. PNT.DNCC.INEN. 145. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN. V 0.1.

4. PNT.DNCC.INEN. 146. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN ALTA DEFINICIÓN. V 0.1.



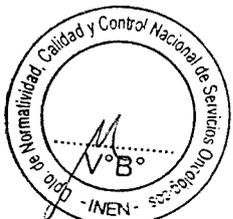
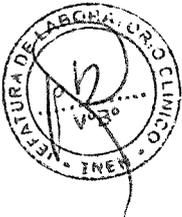
5. PNT.DNCC.INEN. 147. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN. V 0.1.

6. PNT.DNCC.INEN. 148. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR. V 0.1.

7. PNT.DNCC.INEN. 149. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PREPARACIÓN DE TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS, CRIOPRESERVACIÓN. V 0.1.



8. PNT.DNCC.INEN. 150. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MANTENIMIENTO DE UNA BOLSA DE CÉLULAS CRIOPRESERVADAS DURANTE 30 DÍAS. V 0.1.



**PNT.DNCC.INEN.143. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DQ-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-DQ-SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento para el análisis de tipificación molecular HLA-DQ-SSO en resolución intermedia.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 86816.02
- Código Tarifario INEN: 240113

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para la tipificación molecular HLA-DQ-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 firmar los resultados del 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 del Equipo Funcional de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).

**VI. LINEAMIENTOS**

- 6.1 El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Calidad del Equipo Funcional de Patología Clínica del INEN.
- 6.2 El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Bioseguridad del Equipo Funcional de Patología Clínica del 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.

**PNT.DNCC.INEN.143. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DQ-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

- 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  $\beta$ 2-microglobulina.

Aunque la  $\beta$ 2-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 específica 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-ficoeritina (SAPE) (5).

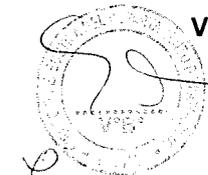
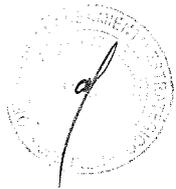
El producto de PCR se desnaturaliza y vuelve a hibridar con sondas de ADN complementarias conjugadas con microesferas cifradas de forma fluorescente. Un analizador de flujo identifica la intensidad de fluorescencia de la PE (ficoeritina) en cada microesfera. La asignación de la tipificación de HLA se basa en el patrón de reacción comparado con patrones asociados a secuencias de genes HLA publicadas (6).

**IX. 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) del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC del Equipo Funcional de Patología Clínica.

**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



**PNT.DNCC.INEN.143. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DQ-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

- Agitador (Vortex)
- Citómetro de flujo LABScan™ 100 – Sistema Luminex 200
- Congeladora eléctrica vertical hasta -80° C
- Microcentrifuga
- Termociclador
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 12 000 Btu tipo split
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 24 000 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 µL - 5000 µL
- Micropipeta volumen variable 10 µL - 100 µL
- Micropipeta volumen fijo 50 µL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 0.5 µL - 10 µL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 10 µL - 100 µL
- Gradilla de polipropileno para 96 tubos de 1.5 mL - 2 mL (caja X 4 unidades)
- 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 melamina

**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

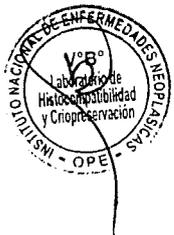
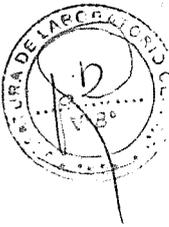
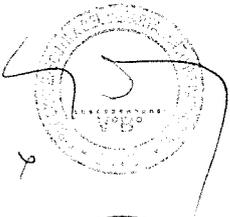
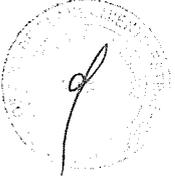
**PNT.DNCC.INEN.143. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DQ-SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA V.01**

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

- 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 cód. ref. 05x ce505x negro
- Placas microtest PS fondo V
- Tips estéril con filtro 0.1 µL - 10 µL x 96 unidades
- Tips con filtro 200 µL x 96 unidades
- Tips 200 µL x 1000 unidades
- Marcador de peso molecular (100Pb Ladder) X 250 µL
- Tips 0.5 µL -10 µL x 500 unidades
- 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 DQ
- Primer set LOCUS DQ
- Mezcla de perlas LOCUS DQ
- R-ficoeritrina-estreptidina conjugada SAPE
- Taq polimerasa
- 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 µL
- Kit de tipificación molecular de HLA-DQ-genómico por sec. oligonucleótidos (SSO) x 20 determinaciones
- PCR Tray
- PE conjugated streptavidin liofilizado



**PNT.DNCC.INEN.143. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DQ-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

- Reactivo SYBR SAFE P/T inción de electroforesis ADN en gel agarosa 10X

**11.2.1 Materiales de control:**

- 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:****a) 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.

**13.4. Conservación y manejo:**

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



**PNT.DNCC.INEN.143. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DQ-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

**XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Para desarrollar el procedimiento de tipificación molecular HLA-DQ-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 de 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.

14.2.3 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 Amplificación de los genes HLA:**

14.3.1 Según DI PC INS 06 AMPLIFICACIÓN.

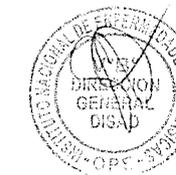
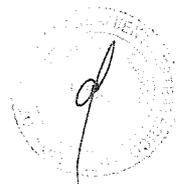
**14.4 Separación mediante electroforesis:**

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: Fijarse en la Tabla N° 1 para los volúmenes de reactivos necesitados según el número de muestras.

- a) Programar 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.
- b) 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.
- c) Combine la cantidad apropiada Mezcla de Perlas (BM) LOCUS DQ, 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.
- d) Alícuotar el volumen apropiado de Buffer de SAPE (SB) según la Tabla N° 2: "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE". Recordar de guardar los reactivos no usados a 4 °C. Preparar 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 sólo cuando sea necesario y retornar inmediatamente a una temperatura entre 2° y 8 °C.



**PNT.DNCC.INEN.143. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DQ-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

**Tabla N° 1: Volúmenes de reactivos**

Cantidad Muestra	Volúmenes de alícuotas requeridas a temperatura ambiente				Almacenar a 4 °C
	Buffer de Desnaturalización (DB) µL	Buffer de Neutralización (NB) µL	Buffer de Hibridación (HB) µL	Buffer de Lavado (WB) µL	Mezcla de Perlas (BM) µL
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**

Cantidad Pruebas	SAPE reserva (SS) µL	Buffer de SAPE (SB) µL
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.

**14.5.2 Desnaturalización / neutralización:**

- Preparar un baño con hielo molido.
- Colocar una placa de 96 pocillos limpia en un soporte.
- Transferir 5 µL 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.
- Adicionar 2.5 µL de Buffer de Desnaturalización (DB), mezclar e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 5 µL 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.

**PNT.DNCC.INEN.143. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DQ-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

- f) Colocar la placa de producto de neutralización en un baño de hielo. Evite la contaminación del producto PCR con agua.

**14.5.3 Hibridación:**

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

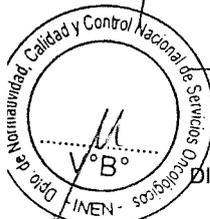
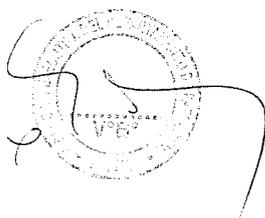
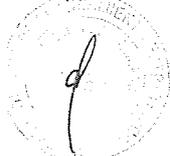
- a) Combinar volúmenes apropiados de Mezcla de Perlas (BM) LOCUS DQ, Buffer de Hibridación (HB), vórtice. Consulte la tabla.
- b) Adicionar 38 µL de Mezcla de Perlas y el Buffer de Hibridación a cada pocillo.
- c) Quitar la placa del baño de hielo, cubra la placa con el sello, y vórtice.
- d) Quitar 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) Colocar la placa en el soporte, quite el sello de la placa y rápidamente añada 100 µL de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugue la placa por 5 minutos entre 1000 g - 1300 g.
- f) Repetir el paso e) dos veces más por un total de 3 lavados. Recordar preparar 1X SAPE Solución (SSB) durante la tercera centrifugación. Consultar la Tabla N° 2: "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE".

**14.5.4 Identificación:**

- a) Colocar la placa en el soporte; añadir 50ul. 1X SAPE Solución (SSB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa y vórtice. Colocar 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) Sacar la placa, y colocar en el soporte, luego quitar el sello de la placa, y rápidamente añadir 100 µL de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugar la placa por 5 minutos entre 1000g y 1300 g, colocar en el sostenedor de la bandeja y eliminar el buffer de lavado.
- c) Adicionar 70 µL 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 µL.
- d) Cubrir 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) Llenar 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) Seleccionar el icono plantilla (TEMPLATE) y seleccionar la mezcla de gotas que será usada. Verificar el número de lote seleccionado.



**PNT.DNCC.INEN.143. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DQ-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



- d) Seleccionar 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.
- e) Anotar 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) Seleccionar 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, escojer 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.

**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 del Equipo Funcional de Patología Clínica.

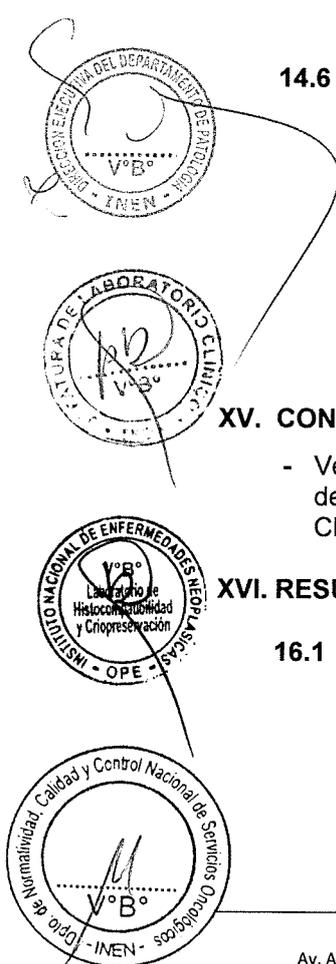
**XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS****16.1 Rango de valores a informar:**

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

- Texto

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

- Texto, describir hallazgos particulares de la prueba realizada.





**PNT.DNCC.INEN.143. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DQ-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

- Indicar de requerimiento de nueva muestra.

**16.2 Rangos de alarma:**

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

- Numérico: No aplica
- Alfabético: No aplica

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

- Texto: No aplica

**16.3 Intervalos de referencia:**

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

- Numérico: No aplica
- Alfabético: No aplica

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

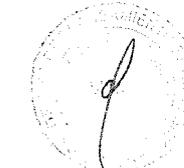
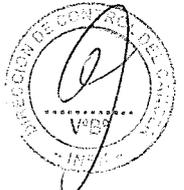
- Texto: No aplica

**XVII. 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.
4. Jones, Y. E., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. MHC Class II proteins and disease: a structural perspective. Nature Reviews Immunology, 2006.271-282.
5. Neefjes, J., Jongmsa, M. L., Paul, P., & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nature Reviews Immunology. 2011. 11. 823-836.
6. Software HLA Fusion™ v. 2.x. Manual del Usuario Software HLA Fusion™. ONE LAMBDA INC. 2010.

**XVIII. ANEXOS**

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





**PNT.DNCC.INEN.143. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DQ-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° 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
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



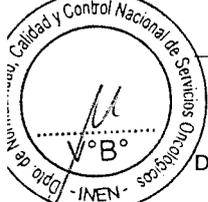
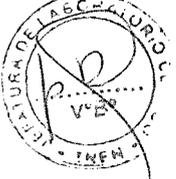
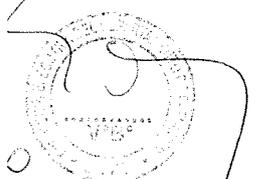
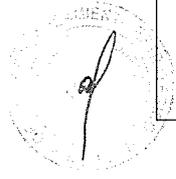
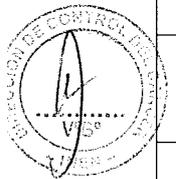


### PNT.DNCC.INEN.143. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DQ-SSO EN RESOLUCIÓN INTERMEDIA V.01

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	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 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).</li> <li>- Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.</li> </ul>	25/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael



**PNT.DNCC.INEN.144. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento para el análisis de tipificación molecular HLA-A-SSO en alta definición.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81378.01
- Código Tarifario INEN: 240114

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para la tipificación molecular HLA-A-SSO en alta definición, 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 firmar los resultados del 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 del Equipo Funcional de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).

**VI. LINEAMIENTOS**

- 6.1 El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Calidad del Equipo Funcional de Patología Clínica del INEN.
- 6.2 El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Bioseguridad del Equipo Funcional de Patología Clínica del 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.

**PNT.DNCC.INEN.144. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

- 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  $\beta$ 2-microglobulina.

Aunque la  $\beta$ 2-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 específica 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-ficoeritina (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 (ficoeritina) 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).

**IX. 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) del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC del Equipo Funcional de Patología Clínica.

**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

**PNT.DNCC.INEN.144. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

- Agitador (Vortex)
- Citómetro de flujo LABScanTM 100 – Sistema Luminex 200
- Congeladora eléctrica vertical hasta -80° C
- Microcentrifuga
- Termociclador
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 12 000 Btu tipo Split
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 24 000 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 µL - 5000 µL
- Micropipeta volumen variable 10 µL - 100 µL
- Micropipeta volumen fijo 50 µL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 0.5 µL - 10 µL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 10 µL - 100 µL
- Gradilla de polipropileno para 96 tubos de 1.5 mL - 2 mL (caja X 4 unidades)
- 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

**XI. SUMINISTROS****11.1 Insumos y material:**

- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas

**PNT.DNCC.INEN.144. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

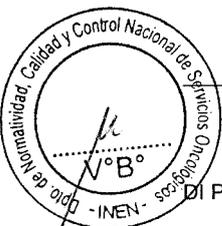
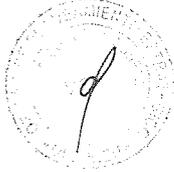
- Bota descartable antideslizante
- Gorro descartable unisex x 100 unidades
- Guante para examen descartable talla M x 100 unidades
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Mandil descartable estéril talla estándar tips con filtro 100 µL
- Bolígrafo (lapicero) de tinta líquida punta fina color azul
- Cuaderno empastado rayado tamaño A5 x 200 hojas
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para HP cód. ref. 05x ce505x negro
- Placas microtest PS fondo V
- Tips estéril con filtro 0.1 µL - 10 µL x 96 unidades
- Tips con filtro 200 µL x 96 unidades
- Tips 200 µL x 1000 unidades
- Marcador de peso molecular (100 Pb Ladder) x 250 µL
- Tips 0.5 µL -10 µL x 500 unidades
- 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 A
- Primer set LOCUS A
- Mezcla de perlas LOCUS A
- R-ficoeritrina-estreptidina conjugada SAPE
- Taq polimerasa
- 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 µL
- Kit de tipificación molecular de HLA-A-genómico por sec. Oligonucleótidos (SSO) x 20 determinaciones
- PCR Tray
- PE Conjugated streptavidin liofilizado

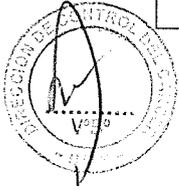
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: [www.inen.sld.pe](http://www.inen.sld.pe) e-mail: [postmaster@inen.sld.pe](mailto:postmaster@inen.sld.pe)



**PNT.DNCC.INEN.144. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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



- 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 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:**

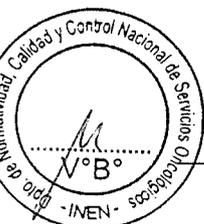
- ADN.

**13.3. Recipiente:**

- Tubo cónico 1.5 mL.

**13.4. Conservación y manejo:**

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



**PNT.DNCC.INEN.144. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

**XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Para desarrollar el procedimiento de tipificación molecular HLA-A-SSO en alta definición, 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 de 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.

14.2.3 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 Amplificación de los genes HLA:**

14.3.1 Según DI PC INS 06 AMPLIFICACIÓN.

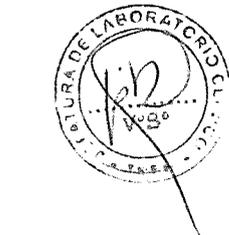
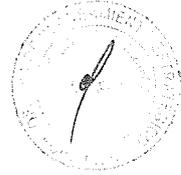
**14.4 Separación mediante electroforesis:**

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: Fijarse en la Tabla N° 1 para los volúmenes de reactivos necesitados según el número de muestras.

- Programar 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.
- 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.
- Combinar 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.
- 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.



**PNT.DNCC.INEN.144. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

**Tabla N° 1: Volúmenes de reactivos**

Cantidad Muestra	Volúmenes de alícuotas requeridas a temperatura ambiente				Almacenar a 4 °C
	Buffer de Desnaturalización (DB) µL	Buffer de Neutralización (NB) µL	Buffer de Hibridación (HB) µL	Buffer de Lavado (WB) µL	Mezcla de Perlas (BM) µL
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**

Cantidad Pruebas	SAPE reserva (SS) µL	Buffer de SAPE (SB) µL
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.

**14.5.2 Desnaturalización / neutralización:**

- Preparar un baño con hielo molido.
- Colocar una placa de 96 pocillos limpia en un soporte.
- Transferir 5 µL de cada muestra de DNA amplificado en un pocillo limpio de una placa de 96 pocillos. Asegurarse que la ubicación y la identificación sean anotadas.
- Adicionar 2.5 µL de Buffer de Desnaturalización (DB), mezclar e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 5 µL 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.
- Colocar la placa de producto de neutralización en un baño de hielo. Evitar la contaminación del producto PCR con agua.

**14.5.3 Hibridación:**

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

**PNT.DNCC.INEN.144. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

- Combinar volúmenes apropiados de Mezcla de Perlas (BM) LOCUS A, Buffer de Hibridación (HB), vórtice. Consultar la tabla.
- Adicionar 38 µL de mezcla del buffer de hibridación y perlas a cada pocillo.
- Quitar la placa del baño de hielo, cubra la placa con el sello, y vórtice.
- Quitar 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.
- Colocar la placa en el soporte, quite el sello de la placa y rápidamente añada 100 µL de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugue la placa por 5 minutos entre 1000 g - 1300 g.
- Repetir el paso e) dos veces más por un total de 3 lavados. Recordar preparar 1X SAPE Solución (SSB) durante la tercera centrifugación. Consultar la Tabla N° 2: "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE".

**14.5.4 Identificación:**

- Colocar 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.
- Sacar la placa, y colocarla 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. Centrifugar la placa por 5 minutos entre 1000g y 1300 g, colocar en el sostenedor de la bandeja y eliminar el buffer de lavado.
- Adicionar 70 µL del Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, mezclar 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 µL.
- Cubra la placa con sello de placa y papel de aluminio. Mantener 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 Leyendo muestras:**

- Llenar 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.
- Seleccionar el icono plantilla (TEMPLATE) y seleccionar la mezcla de gotas que será usada. Verifique el número de lote seleccionado.
- Seleccionar 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.
- Anotar 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

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: [www.inen.sld.pe](http://www.inen.sld.pe) e-mail: [postmaster@inen.sld.pe](mailto:postmaster@inen.sld.pe)

**PNT.DNCC.INEN.144. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

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:**

- 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.

**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 del Equipo Funcional de Patología Clínica.

**XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS****16.1 Rango de valores a informar:**

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-A- SSO en alta definición

- Texto

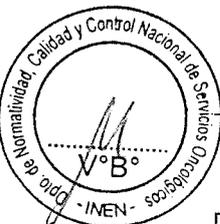
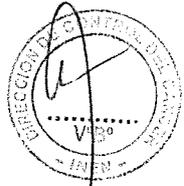
Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-A-SSO en alta definición

- 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-A- SSO en alta definición

- Numérico: No aplica
- Alfabético: No aplica



**PNT.DNCC.INEN.144. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-A-SSO en alta definición

- Texto: No aplica

**16.3 Intervalos de referencia:**Sub análisis 1: tipificación molecular HLA-DQ- SSO en alta definición

- Numérico: No aplica

- Alfabético: No aplica

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-A-SSO en alta definición

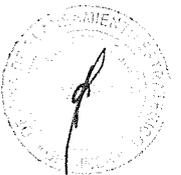
- Texto: No aplica

**XVII. 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.
4. Jones, Y. E., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. MHC Class II proteins and disease: a structural perspective. Nature Reviews Immunology, 2006.271-282.
5. Neefjes, J., Jongmsa, M. L., Paul, P., & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nature Reviews Immunology. 2011. 11. 823-836.
6. Software HLA Fusion™ v. 2.x. Manual del Usuario Software HLA Fusion™. ONE LAMBDA INC. 2010.

**XVIII. ANEXOS**

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



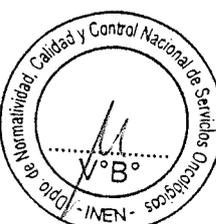
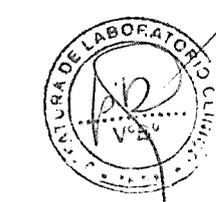
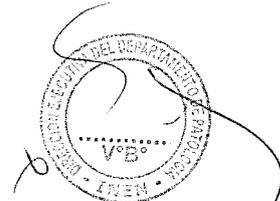
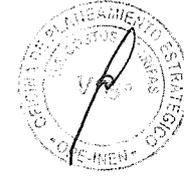
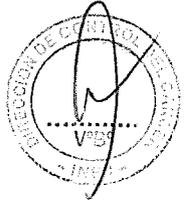


**PNT.DNCC.INEN.144. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - V.01**

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° 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
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



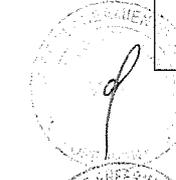
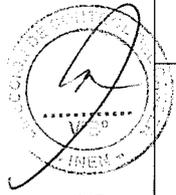


# PNT.DNCC.INEN.144. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-A-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - V.01

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	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 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).</li> <li>- Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.</li> </ul>	25/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael



**PNT.DNCC.INEN.145. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento para el análisis de tipificación molecular HLA-B-SSO en alta definición.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81378.02
- Código Tarifario INEN: 240115

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para la tipificación molecular HLA-B-SSO en alta definición, en el Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación del Equipo Funcional de Patología Clínica.

**IV. RESPONSABILIDADES**

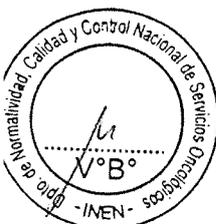
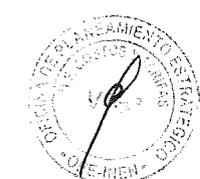
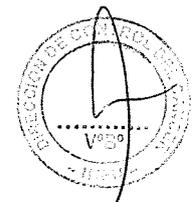
- Médico Patólogo Clínico del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de supervisar el proceso, confirmar análisis y firmar los resultados del análisis.
- Biólogo/a del Grupo de Trabajo Análisis, del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: 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 del Equipo Funcional de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).

**VI. LINEAMIENTOS**

- 6.1 El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Calidad del Equipo Funcional de Patología Clínica del INEN.
- 6.2 El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Bioseguridad del Equipo Funcional de Patología Clínica del 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.



**PNT.DNCC.INEN.145. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

- 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  $\beta$ 2-microglobulina.

Aunque la  $\beta$ 2-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 específica 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-ficoeritina (SAPE) (5).

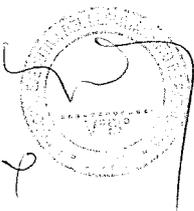
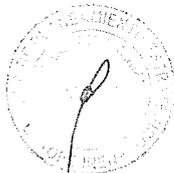
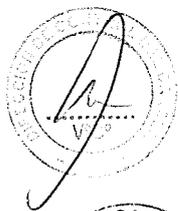
El producto de PCR se desnaturaliza y vuelve a hibridar con sondas de ADN complementarias conjugadas con microesferas cifradas de forma fluorescente. Un analizador de flujo identifica la intensidad de fluorescencia de la PE (ficoeritina) en cada microesfera. La asignación de la tipificación de HLA se basa en el patrón de reacción comparado con patrones asociados a secuencias de genes HLA publicadas (6).

**IX. 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) del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC del Equipo Funcional de Patología Clínica.

**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



**PNT.DNCC.INEN.145. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

- 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 12 000 Btu tipo Split
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 24 000 Btu tipo piso techo
- 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 volumen variable 1000 µL - 5000 µL
- Micropipeta volumen variable 10 µL - 100 µL
- Micropipeta volumen fijo 50 µL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 0.5 µL - 10 µL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 10 µL - 100 µL
- Gradilla de polipropileno para 96 tubos de 1.5 mL - 2 mL (caja X 4 unidades)
- 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

**XI. SUMINISTROS****11.1 Insumos y material:**

- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas

**PNT.DNCC.INEN.145. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

- 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 cód. ref. 05x ce505x negro
- Placas microtest PS fondo V
- Tips estéril con filtro 0.1 µL - 10 µL x 96 unidades
- Tips con filtro 200 µL x 96 unidades
- Tips 200 µL x 1000 unidades
- Marcador de peso molecular (100Pb Ladder) x 250 µL
- Tips 0.5 µL -10 µL x 500 unidades
- 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 B
- Primer set LOCUS B
- Mezcla de perlas LOCUS B
- R-ficoeritrina-estreptidina conjugada SAPE
- Taq polimerasa
- 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 µL
- Kit de tipificación molecular de HLA-B-genómico por sec. Oligonucleótidos (SSO) x 20 determinaciones
- PCR Tray
- PE Conjugated streptavidin liofilizado

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: [www.inen.sld.pe](http://www.inen.sld.pe) e-mail: [postmaster@inen.sld.pe](mailto:postmaster@inen.sld.pe)

**PNT.DNCC.INEN.145. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

- 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 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:**

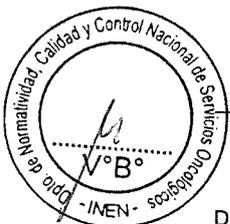
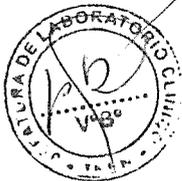
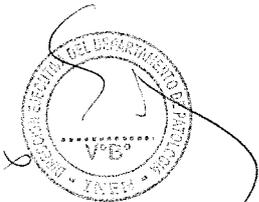
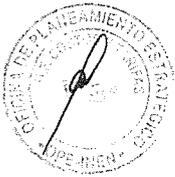
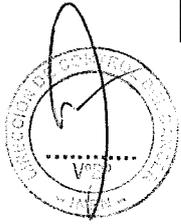
- ADN.

**13.3. Recipiente:**

- Tubo cónico 1.5 mL.

**13.4. Conservación y manejo:**

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



**PNT.DNCC.INEN.145. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

**XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Para desarrollar el procedimiento de tipificación molecular HLA-B-SSO en alta definición, 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 de 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.

14.2.3 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 Amplificación de los genes HLA.**

14.3.1 Según DI PC INS 06 AMPLIFICACIÓN.

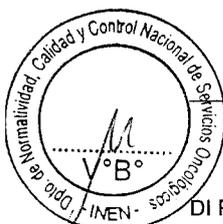
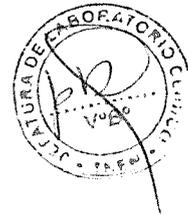
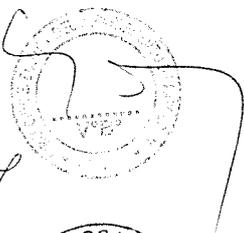
**14.4 Separación mediante electroforesis:**

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: fijarse en la Tabla N° 1 para los volúmenes de reactivos necesitados según el número de muestras.

- Programar 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.
- 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 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.



**PNT.DNCC.INEN.145. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

**Tabla N° 1: Volúmenes de reactivos**

Cantidad Muestra	Volúmenes de alícuotas requeridas a temperatura ambiente				Almacenar a 4°C
	Buffer de Desnaturalización (DB) µL	Buffer de Neutralización (NB) µL	Buffer de Hibridación (HB) µL	Buffer de Lavado (WB) µL	Mezcla de Perlas (BM) µL
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**

Cantidad Pruebas	SAPE reserva (SS) µL	Buffer de SAPE (SB) µL
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.

**14.5.2 Desnaturalización / neutralización:**

- Preparar un baño con hielo molido.
- Colocar una placa de 96 pocillos limpia en un soporte.
- Transferir 5 µL de cada muestra de DNA amplificado en un pocillo limpio de una placa de 96 pocillos. Asegurarse que la ubicación y la identificación sean anotadas.
- Adicionar 2.5 µL de Buffer de Desnaturalización (DB), mezclar e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 5 µL 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.
- Colocar la placa de producto de neutralización en un baño de hielo. Evitar la contaminación del producto PCR con agua.

**14.5.3 Hibridación:**

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

**PNT.DNCC.INEN.145. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

- Combine volúmenes apropiados de Mezcla de Perlas (BM) LOCUS B, Buffer de Hibridación (HB), vórtice. Consulte la tabla.
- Adicionar 38  $\mu$ L de mezcla del Buffer de Hibridación y Perlas a cada pocillo.
- Quitar la placa del baño de hielo, cubra la placa con el sello, y vórtice.
- Quitar la placa del soporte y colóquela en el termociclador (60°C) pre calentado, utilizar una almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa, incubar por 15 minutos.
- Colocar la placa en el soporte, quitar el sello de la placa y rápidamente añadir 100  $\mu$ L de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugar la placa por 5 minutos entre 1000 g - 1300 g.
- Repetir el paso e) dos veces más por un total de 3 lavados. Recordar preparar 1X SAPE Solución (SSB) durante la tercera centrifugación. Consultar la Tabla N° 2 "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE".

**14.5.4 Identificación:**

- Colocar la placa en el soporte; añadir 50 uL 1X SAPE Solución (SSB) a cada pocillo, y cubrir con sello la placa y vórtice. Colocar la placa de PCR en el termociclador (60 °C) pre calentado, utilice una almohadilla de presión, cierre y apretar la tapa, incubar por 5 minutos.
- Sacar la placa, y colocarla en el soporte, quitar el sello de la placa, y rápidamente añadir 100 uL de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugar la placa por 5 minutos entre 1000g y 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, mezclar con cuidado y trasladar a la placa para leer usando una pipeta multicanal de 8 o 12 canales. El volumen final deberá ser de al menos 80  $\mu$ L.
- Cubrir la placa con sello de placa y papel de aluminio. Mantener 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 Leyendo 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.
- Seleccione el icono SETTINGS para asignar el número de muestras que serán probadas, el volumen de la muestra debe estar a 50  $\mu$ L 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

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: [www.inen.sld.pe](http://www.inen.sld.pe) e-mail: [postmaster@inen.sld.pe](mailto:postmaster@inen.sld.pe)

**PNT.DNCC.INEN.145. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

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:**

- 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.

**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 del Equipo Funcional de Patología Clínica.

**XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS****16.1 Rango de valores a informar:**

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-B- SSO en alta definición

- Texto

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

- 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-B- SSO en alta definición

- Numérico: No aplica
- Alfabético: No aplica

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

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: [www.inen.sld.pe](http://www.inen.sld.pe) e-mail: [postmaster@inen.sld.pe](mailto:postmaster@inen.sld.pe)



**PNT.DNCC.INEN.145. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

- Texto: No aplica

**16.3 Intervalos de referencia:**

Sub análisis 1: tipificación molecular HLA-B- SSO en alta definición

- Numérico: No aplica
- Alfabético: No aplica

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

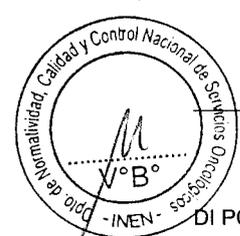
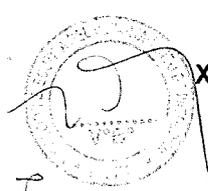
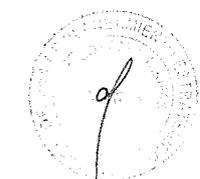
- Texto: No aplica

**XVII. 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. pp. 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.
4. Jones, Y. E., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. MHC Class II proteins and disease: a structural perspective. Nature Reviews Immunology, 2006.271-282.
5. Neefjes, J., Jongmsa, M. L., Paul, P., & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nature Reviews Immunology. 2011. 11. pp.823-836.
6. Software HLA Fusion™ v. 2.x. Manual del Usuario Software HLA Fusion™. ONE LAMBDA INC. 2010.

**XVIII. ANEXOS**

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



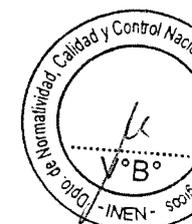
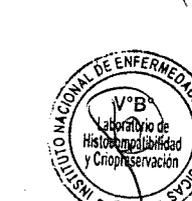
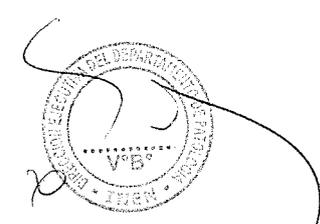
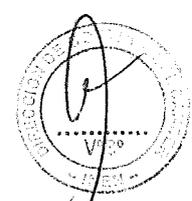


**PNT.DNCC.INEN.145. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - V.01**

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° 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
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





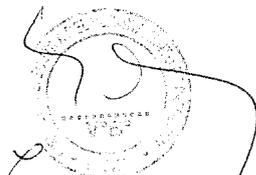
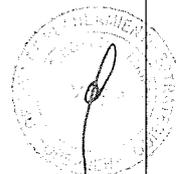
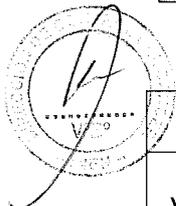
### PNT.DNCC.INEN.145. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-B-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - V.01

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	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 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).</li> <li>- Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.</li> </ul>	25/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael





**PNT.DNCC.INEN.146. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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 ALTA DEFINICIÓN**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento para el análisis de tipificación molecular HLA-C-SSO en alta definición.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81378.03
- Código Tarifario INEN: 240116

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para la tipificación molecular HLA-C-SSO en alta definición, en el Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación del Equipo Funcional de Patología Clínica.

**IV. RESPONSABILIDADES**

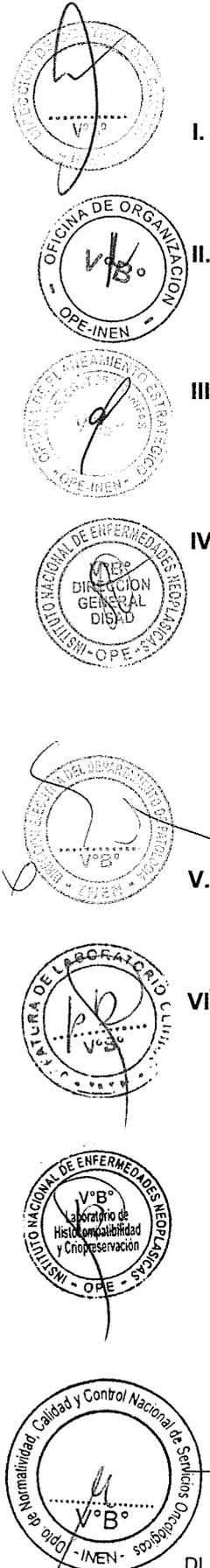
- Médico Patólogo Clínico del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de supervisar el proceso, confirmar análisis y firmar los resultados del análisis.
- Biólogo/a del Grupo de Trabajo Análisis, del Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: 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 del Equipo Funcional de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).

**VI. LINEAMIENTOS**

- 6.1 El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Calidad del Equipo Funcional de Patología Clínica del INEN.
- 6.2 El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Bioseguridad del Equipo Funcional de Patología Clínica del 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.



**PNT.DNCC.INEN.146. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

- 6.6 Los buffers con excepción del buffer SAPE tienen un rango de temperatura entre  $-80^{\circ}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ , pudiendo ser congelados y descongelados hasta terminar su uso.
- 6.7 Las perlas son más estables cuando están congeladas y se deben mantener así hasta su uso. Una vez descongelada manténgase a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 6.8 Los sets de primers y el D-mix es más estable a un rango de temperatura de  $-80^{\circ}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ , 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  $\text{CD8}^+$  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  $\beta 2$ -microglobulina.

Aunque la  $\beta 2$ -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).

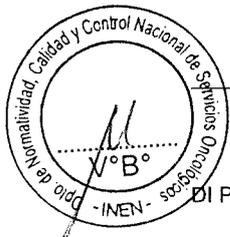
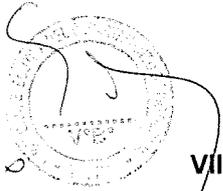
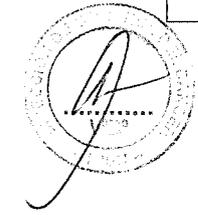
**VIII. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA**

El método de tipificación inversa de ADN mediante reacción en cadena de polimerasa de secuencia específica 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-ficoeritina (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 (ficoeritina) 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).

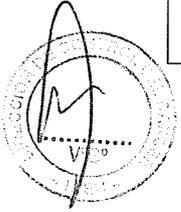
**IX. SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES MEDIOAMBIENTALES**

Cumplir las Normas de Bioseguridad 7.2.3. **Nivel de Bioseguridad 2 (BSL 2)**: Máxima, Ver Manual de Bioseguridad (DI PC-PC MAN 02) del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC del Equipo Funcional de Patología Clínica.



**PNT.DNCC.INEN.146. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

**X. EQUIPAMIENTO****10.1 Equipos (médico, biomédico, electromecánico, informático):**

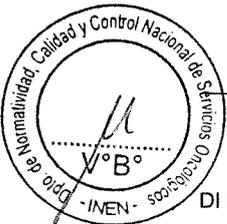
- Placa para PCR de 96 pocillos
- Placas de tipificación de 96 pocillos para citómetro de flujo LABScanTM 100
- Agitador (Vortex)
- Citómetro de flujo LABScanTM 100 – Sistema Luminex 200
- Congeladora eléctrica vertical hasta -80 °C
- Microcentrifuga
- Termociclador
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 12 000 Btu tipo Split
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 24 000 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 µL - 5000 µL
- Micropipeta volumen variable 10 µL - 100 µL
- Micropipeta volumen fijo 50 µL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 0.5 µL - 10 µL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 10 µL - 100 µL
- Gradilla de polipropileno para 96 tubos de 1.5 mL - 2 mL (caja X 4 unidades)
- 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 melamina



**PNT.DNCC.INEN.146. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

**10.4 Software:**

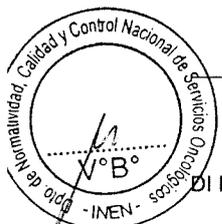
- Sistema Luminex 200

**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 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 cód. ref. 05x ce505x negro
- Placas microtest PS fondo V
- Tips estéril con filtro 0.1 µL - 10 µL x 96 unidades
- Tips con filtro 200 µL x 96 unidades
- Tips 200 µL x 1000 unidades
- Marcador de peso molecular (100Pb Ladder) x 250 µL
- Tips 0.5 µL -10 µL x 500 unidades
- 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 C
- Primer set LOCUS C
- Mezcla de perlas LOCUS C



**PNT.DNCC.INEN.146. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

- R-ficoeritrina-estreptidina conjugada SAPE
- Taq polimerasa
- 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-C-genómico por sec. Oligonucleótidos (SSO) x 20 determinaciones
- PCR Tray
- PE Conjugated streptavidin liofilizado
- 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 20L

**11.2.2 Patrón o calibrador**

- Perlas de control LX200 VERIFICATION KIT

**XII. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****12.1 Servicios Técnicos:****a) 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.

**13.4. Conservación y manejo:**

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

**PNT.DNCC.INEN.146. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

**XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Para desarrollar el procedimiento de tipificación molecular HLA-C-SSO en alta definición, 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 de 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.

14.2.3 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 Amplificación de los genes HLA:**

14.3.1 Según DI PC INS 06 AMPLIFICACIÓN.

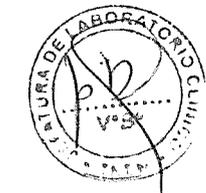
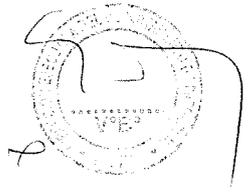
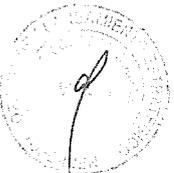
**14.4 Separación mediante electroforesis:**

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: fijarse en la Tabla N° 1 para los volúmenes de reactivos necesarios según el número de muestras.

- a) Programar el termociclador para una temperatura definida a 60 °C. Durante la incubación, recordar sellar la placa de PCR, utilice una almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa.
- b) 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.
- c) Combinar la cantidad apropiada Mezcla de perlas (BM) LOCUS C, 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.
- d) 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.



**PNT.DNCC.INEN.146. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

**Tabla N° 1: Volúmenes de reactivos**

Cantidad Muestra	Volúmenes de alícuotas requeridas a temperatura ambiente				Almacenar a 4 °C
	Buffer de Desnaturalización (DB) µL	Buffer de Neutralización (NB) µL	Buffer de Hibridación (HB) µL	Buffer de Lavado (WB) µL	Mezcla de Perlas (BM) µL
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**

Cantidad Pruebas	SAPE reserva (SS) µL	Buffer de SAPE (SB) µL
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.

**14.5.2 Desnaturalización / neutralización:**

- Preparar un baño con hielo molido.
- Colocar una placa de 96 pocillos limpia en un soporte.
- Transferir 5 µL de cada muestra de DNA amplificado en un pocillo limpio de una placa de 96 pocillos. Asegurarse que la ubicación y la identificación sean anotadas.
- Adicionar 2.5 µL de Buffer de Desnaturalización (DB), mezclar e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 5 µL 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.
- Colocar la placa de producto de neutralización en un baño de hielo. Evite la contaminación del producto PCR con agua.

**PNT.DNCC.INEN.146. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

**14.5.3 Hibridación:**

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

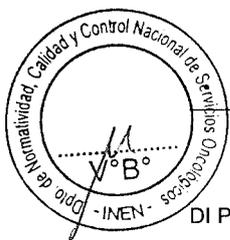
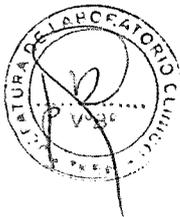
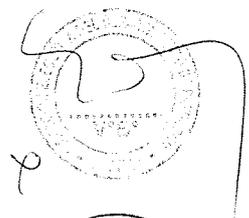
- Combinar volúmenes apropiados de Mezcla de Perlas (BM) LOCUS C, Buffer de Hibridación (HB), vórtice. Consulte la tabla.
- Adicionar 38 µL de mezcla del buffer de hibridación y perlas a cada pocillo.
- Quitar la placa del baño de hielo, cubra la placa con el sello, y vórtice.
- Quitar la placa del soporte y colóquela en el termociclador (60 °C) pre calentado, utilice una almohadilla de presión, cierre y apriete la tapa, incubar por 15 minutos.
- Colocar la placa en el soporte, quitar el sello de la placa y rápidamente añadir 100 µL de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugue la placa por 5 minutos entre 1000 - 1300 g.
- Repetir el paso e) dos veces más por un total de 3 lavados. Recordar preparar 1X SAPE Solución (SSB) durante la tercera centrifugación. Consulte la Tabla N° 2: "Volúmenes de SAPE y Buffer SAPE".

**14.5.4 Identificación:**

- Colocar la placa en el soporte; añadir 50µL 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.
- Sacar la placa, y colóquela en el soporte, quite el sello de la placa, y rápidamente añada 100 µL de Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugue la placa por 5 minutos entre 1000g a 1300g, colocar en el sostenedor de la bandeja y eliminar el buffer de lavado.
- Adicionar 70 µL del Buffer de Lavado (WB) a cada pocillo, mezclar con cuidado y trasladar a la placa para leer usando una pipeta multicanal de 8 o 12 canales. El volumen final deberá ser de al menos 80 µL.
- Cubrir 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.

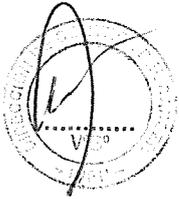
**14.5.5 Leyendo muestras:**

- Llenar 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.
- Seleccionar el icono plantilla (TEMPLATE) y seleccionar la mezcla de gotas que será usada. Verifique el número de lote seleccionado.



**PNT.DNCC.INEN.146. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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



- d) Seleccionar 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.
- e) Anotar 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) Seleccionar 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, escoger el icono SAVE.

**14.5.6 Cerrando la máquina:**

- a) Lavar 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.

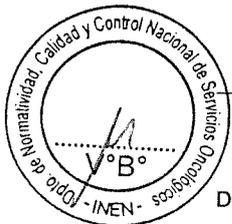
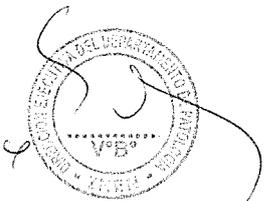
**XV. CONTROL DE LA CALIDAD ANALÍTICA**

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

**XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS****16.1 Rango de valores a informar:**

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-C- SSO en alta definición

- Texto



**PNT.DNCC.INEN.146. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - 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

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-C-SSO en alta definición

- 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-C-SSO en alta definición

- Numérico: No aplica
- Alfabético: No aplica

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-C-SSO en alta definición

- Texto: No aplica

**16.3 Intervalos de referencia:**Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-C-SSO en alta definición

- Numérico: No aplica
- Alfabético: No aplica

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-C-SSO en alta definición

- Texto: No aplica

**XVII. 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.
4. Jones, Y. E., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. MHC Class II proteins and disease: a structural perspective. Nature Reviews Immunology, 2006.271-282.
5. Neefjes, J., Jongsmá, M. L., Paul, P., & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nature Reviews Immunology. 2011. 11. 823-836.
6. Software HLA Fusion™ v. 2.x. Manual del Usuario Software HLA Fusion™. ONE LAMBDA INC. 2010.

**XVIII. ANEXOS**

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

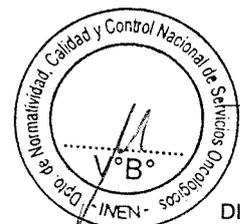
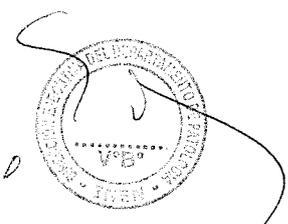
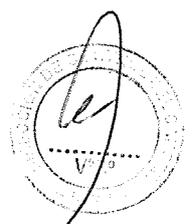


**PNT.DNCC.INEN.146. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - V.01**

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° 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
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



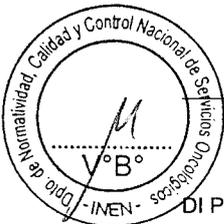
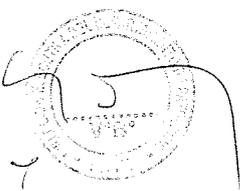
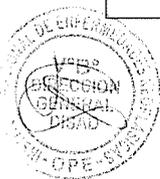
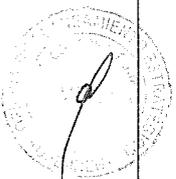
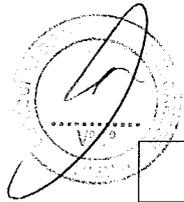


**PNT.DNCC.INEN.146. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-C-SSO EN ALTA DEFINICIÓN - V.01**

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	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 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).</li> <li>- Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.</li> </ul>	25/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael



**PNT.DNCC. INEN.147. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN 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-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento para el análisis de Tipificación Molecular HLA-DR-SSO en alta definición.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSAL): 81378.04
- Código Tarifario INEN: 240117

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para la Tipificación Molecular HLA-DR-SSO en alta definición, 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 firmar los resultados del 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/a 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 del Equipo Funcional de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).

**VI. LINEAMIENTOS**

- 6.1 El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Calidad del Equipo Funcional de Patología Clínica del INEN.
- 6.2 El presente Procedimiento Normalizado de Trabajo se encuentra bajo los lineamientos del Manual de Bioseguridad del Equipo Funcional de Patología Clínica del 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.

**PNT.DNCC. INEN.147. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN 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

- 6.6 Los buffers con excepción del buffer SAPE tienen un rango de temperatura entre  $-80^{\circ}$  a  $25^{\circ}$  C, pudiendo ser congelados y descongelados hasta terminar su uso.
- 6.7 Las perlas son más estables cuando están congeladas y se deben mantener así hasta su uso. Una vez descongelada manténgase a  $4^{\circ}$  C.
- 6.8 Los sets de primers y el D-mix es más estable a un rango de temperatura de  $-80^{\circ}$  a  $-20^{\circ}$  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  $\beta$ 2-microglobulina.

Aunque la  $\beta$ 2-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).

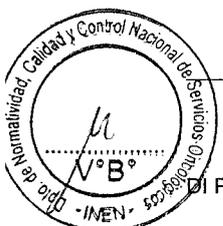
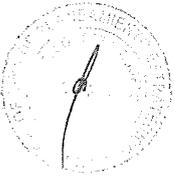
**VIII. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA**

El método de tipificación inversa de ADN mediante reacción en cadena de polimerasa de secuencia específica 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-ficoeritina (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 (ficoeritina) 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).

**IX. 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) del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC del Equipo Funcional de Patología Clínica.



**PNT.DNCC. INEN.147. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN 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

**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 LABScan™ 100
- Agitador (Vortex)
- Citómetro de flujo LABScan™ 100 – Sistema Luminex 200
- Congeladora eléctrica vertical hasta -80° C
- 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
- 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:**

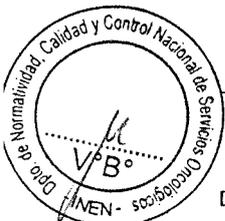
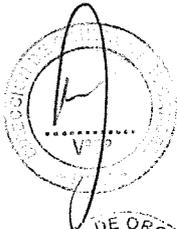
- Micropipeta volumen variable 1000 µL - 5000 µL
- Micropipeta volumen variable 10 µL - 100 µL
- Micropipeta volumen fijo 50 µL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 0.5 µL - 10 µL
- Micropipeta de 8 canales volumen variable 10 µL - 100 µL
- Gradilla de polipropileno para 96 tubos de 1.5 mL - 2 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 melamina

**10.4 Software:**

- Sistema Luminex 200



**PNT.DNCC. INEN.147. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN V.01**

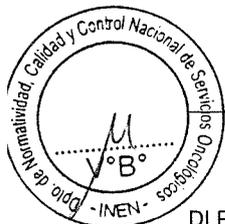
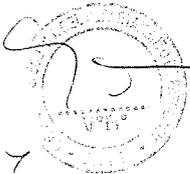
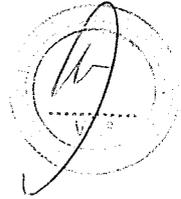
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

**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 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 cód. ref. 05x ce505x negro
- Placas microtest PS fondo V
- Tips estéril con filtro 0.1 µL - 10 µL x 96
- Tips con filtro 200 µL x 96
- Tips 200 µL x 1000
- Marcador de peso molecular (100Pb Ladder) x 250 µL
- Tips 0.5 µL -10 µL x 500
- Plumón de tinta indeleble punta fina

**11.2 Reactivos:**

- Agua molecular
- Agua destilada
- Etanol 70%
- Buffer de desnaturación
- 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
- Agarosa grado biología molecular x 500 g



**PNT.DNCC. INEN.147. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN 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

- Buffer Tae 10X grado biología molecular x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (DNA) en gel de agarosa 10 000X x 200 µL
- 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/Tinción de electroforesis ADN en gel agarosa 10X

## 11.2.1 Materiales de control:

- 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

**13.4. Conservación y manejo:**

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

**PNT.DNCC. INEN.147. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN 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

**XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Para desarrollar el procedimiento de tipificación molecular HLA-DR-SSO en alta definición, 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 de 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.

14.2.3 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 Amplificación de los genes HLA:**

14.3.1 Según DI PC INS 06 AMPLIFICACIÓN.

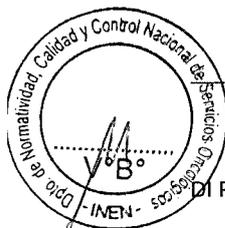
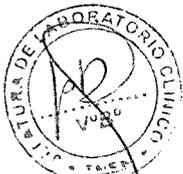
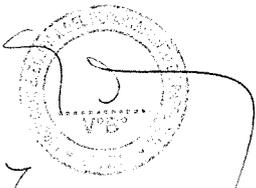
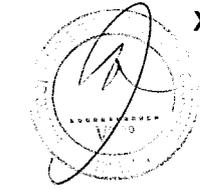
**14.4 Separación mediante electroforesis:**

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: Fijarse en la Tabla N° 1 para los volúmenes de reactivos necesitados según el número de muestras.

- a) 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.
- b) 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.
- c) 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.
- d) 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.



**PNT.DNCC. INEN.147. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN 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**Tabla N° 1: Volúmenes de reactivos**

Cantidad Muestra	Volúmenes de alícuotas requeridas a temperatura ambiente				Almacenar a 4°C
	Buffer de Desnaturalización (DB) µL	Buffer de Neutralización (NB) µL	Buffer de Hibridación (HB) µL	Buffer de Lavado (WB) µL	Mezcla de Perlas (BM) µL
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**

Cantidad Pruebas	SAPE reserva (SS) µL	Buffer de SAPE (SB) µL
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.

**14.5.2 Desnaturalización / neutralización:**

- Prepare un baño con hielo molido.
- Coloque una placa de 96 pocillos limpia en un soporte.
- Transfiere 5 µL 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.
- Adicionar 2.5 µL de Buffer de Desnaturalización (DB), mezclar e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 5 µL 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

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: [www.inen.sld.pe](http://www.inen.sld.pe) e-mail: [postmaster@inen.sld.pe](mailto:postmaster@inen.sld.pe)

**PNT.DNCC. INEN.147. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN 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

**14.5.3 Hibridación:**

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

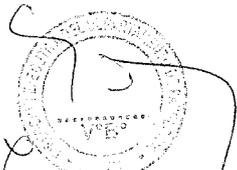
- Combine volúmenes apropiados de mezcla de perlas (BM) LOCUS DR, Buffer de Hibridación (HB), vórtice. Consulte la tabla.
- Adicionar 38 µL de mezcla del Buffer de hibridación y perlas a cada pocillo.
- Quite la placa del baño de hielo, cubra la placa con el sello, y vórtice.
- Quite la placa del soporte 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 µL de Buffer de lavado (WB) a cada pocillo, y cubra con sello la placa. Centrifugue la placa por 5 minutos entre 1000 - 1300 g.
- Repetir el paso e) 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:**

- Coloque la placa en el soporte; añadir 50µL 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.
- Adicionar 70 µL 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 µL.
- 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 Leyendo 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.



**PNT.DNCC. INEN.147. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN 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

- d) 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.
- 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:**

- 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.

**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 del Equipo Funcional de Patología Clínica.

**XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS****16.1 Rango de valores a informar:**Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-DR- SSO en alta definición

- Texto

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-DR-SSO en alta definición

- Texto, describir hallazgos particulares de la prueba realizada.





**PNT.DNCC. INEN.147. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN 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

- Indicar de requerimiento de nueva muestra.

**16.2 Rangos de alarma:**

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-DR-SSO en alta definición

- Numérico: No aplica
- Alfabético: No aplica

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-DR-SSO en alta definición

- Texto: No aplica

**16.3 Intervalos de referencia:**

Sub análisis 1: Tipificación molecular HLA-DR-SSO en alta definición

- Numérico: No aplica
- Alfabético: No aplica

Sub análisis 2: Observaciones tipificación molecular HLA-DR-SSO en alta definición

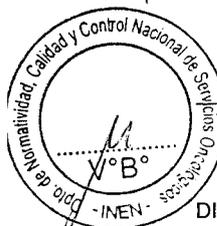
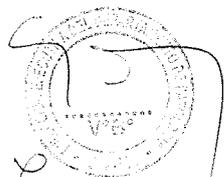
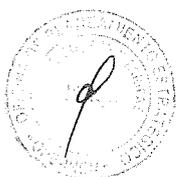
- Texto: No aplica

**XVII. 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.
4. Jones, Y. E., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. MHC Class II proteins and disease: a structural perspective. Nature Reviews Immunology, 2006.271-282.
5. Neefjes, J., Jongstra, M. L., Paul, P., & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nature Reviews Immunology. 2011. 11. 823-836.
6. Software HLA Fusion™ v. 2.x. Manual del Usuario Software HLA Fusion™. ONE LAMBDA INC. 2010.

**XVIII. ANEXOS**

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

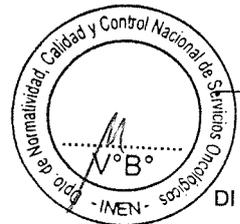
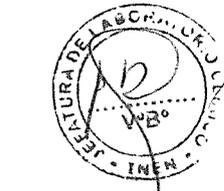
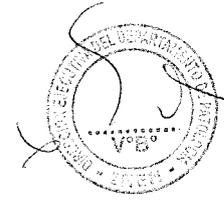




**PNT.DNCC. INEN.147. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN V.01**  
 Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
 Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación

**ANEXO N° 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
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





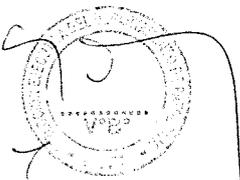
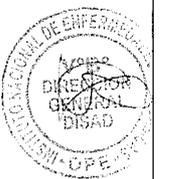
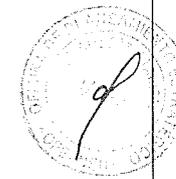
**PNT.DNCC. INEN.147. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR HLA-DR-SSO EN ALTA DEFINICIÓN V.01**

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	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se elabora PNT según D.A 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).</li> <li>- Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.</li> </ul>	25/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael





**PNT.DNCC.INEN.148. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR - 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 CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Criopreservación, congelamiento y almacenamiento de células, cada línea celular; manteniendo su viabilidad y funcionalidad a temperaturas criogénicas.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSAL): 88240
- Código Tarifario INEN: 240202

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para la Criopreservación, congelamiento y almacenamiento de células, cada línea celular; 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, y emitir los resultados de análisis.
- Biólogo(a) del Grupo de Trabajo Criopreservación 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**

- RLI: Recuento leucocitario inicial.
- VCI: Volumen colectado inicial.
- C: constante = 210000000
- Otros términos: Ver Manual de Terminología del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC del Equipo Funcional de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).

**VI. LINEAMIENTOS**

- Los reactivos, a excepción del Dimetilsulfóxido (DMSO), deben mantenerse a 4° C, al momento de la preparación debe colocarse el frasco de preparación dentro de una cubeta de acero inoxidable en baño de hielo, para evitarla la precipitación de la albúmina.

**VII. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas. La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

Av. Angamos Este N° 2520. Lima 34. Teléfono: 201-6500. Fax: 620-4991. Web: [www.inen.sld.pe](http://www.inen.sld.pe) e-mail: [postmaster@inen.sld.pe](mailto:postmaster@inen.sld.pe)

**PNT.DNCC.INEN.148. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR - 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

consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones (1). Sin embargo, este no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar (2).

**VIII. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA**

La bajas temperaturas (asociadas al aumento de la rigidez de la membrana) y la rapidez (décimas de segundo) con la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hacen muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana mediante procesos de transporte activo (dependientes de ATP) (3), la disminución de temperatura desde 25 °C a 10 °C reduce en un 60% la actividad de las bombas dependientes de ATP y la difusión facilitada o como transporte (transporte concomitante de dos moléculas a través de la membrana dependiente una de ellas de ATP y/o iones H<sup>+</sup>), en consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico. Los productos criopreservados se deben almacenar a temperaturas desde -133°C (vapores de nitrógeno líquido) a -196°C (nitrógeno líquido) (4). A estas temperaturas no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas y por tanto las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a temperaturas bajas sino de los procesos de congelación y descongelación. La lesión celular crio inducida se explica en función de la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación (5), Merryman propone la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la congelación (choque osmótico), el volumen celular mínimo se basa en que el volumen se reduce en relación al aumento de la osmolaridad extracelular, a medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad, en este caso los crioprotectores actuarían reduciendo por sus propiedades coligativas la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada (6).

**IX. 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) del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC del Equipo Funcional de Patología Clínica.

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

- Cámara de flujo laminar
- Centrífuga refrigerada
- Refrigeradora conservadora de medicamentos
- Equipo de congelación (CRYOMED)
- Congeladora eléctrica vertical hasta -80°C
- Tanque para nitrógeno líquido
- Tanque para almacenamiento de células

**PNT.DNCC.INEN.148. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR - 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

**10.2 Instrumentales:**

- Tubos tipo falcón estériles
- Pipetas estériles
- Pinzas curvas
- Sellador de bolsas
- Cubeta de acero inoxidable
- Tijera de metal de 8 In
- Bandeja de acero quirúrgico 30 cm x 18 cm x 5 cm
- Pinza Kelly curva 14 cm
- Pinza Kelly recta 14 cm
- 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:**

- Equipo para congelación (CRYOMED)

**XI. SUMINISTROS****11.1 Insumos y material:**

- Algodón hidrófilo x 500 g
- Bolsas de polipropileno para criopreservación
- Campo quirúrgico descartable 90 cm x 90 cm
- Gorro descartable unisex x 100 unidades
- Guante para examen descartable talla M x 100 unidades
- Mandil descartable estéril talla estandar
- Mascarilla descartable quirúrgica de 3 pliegues
- Criovial de polipropileno estéril
- Hielo gel refrigerante
- Gasas estériles.
- Caseteras de metal estériles
- Geles congelados
- Crioviales

**PNT.DNCC.INEN.148. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR - 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

- Agujas estériles
- Jeringa descartable de 20 mL con aguja 21 G x 1 1/2 In
- Frasco de polietileno x 250 mL con tapa
- Hielo gel refrigerante para cadena de frío x 250 g
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Papel Lente para microscopio 10 mm x 15 mm x 100
- Llave de triple vía con extensión x 50 cm
- Botella de vidrio de 500ml
- Recipiente de 500ml con tapa blanca estéril
- Juego de pulmones para criopreservación
- Bolígrafo (lapicero) de tinta líquida punta fina color azul
- Cuaderno empastado rayado tamaño A5 x 200 hojas
- Plumón de tinta indeleble punta delgada Papel bond 75 g tamaño A4
- Tubo de polipropileno
- Tips con filtro 100 UI x 1000
- Tips con filtro 1000 UI x 96
- Tips Estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96

**11.2 Reactivos:**

- Alcohol Etilico (Etanol) 99.8% P.A. X 20 L
- Nitrógeno líquido
- Solución anticoagulante ácido cítrico, citrato y dextrosa (ACD) x 500 mL
- Solucion de Hanks (1X) x 500 mL
- Citrato o ACD
- Albúmina humana 4% o plasma autólogo
- Dimetilsulfóxido x 100 mL (DMSO)

**XII. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****12.1 Servicios Técnicos:****Mantenimiento preventivo de equipamiento:**

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**12.2 Servicios Públicos:**

- Agua

**PNT.DNCC.INEN.148. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR - 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

- Luz

**XIII. MUESTRA****13.1. Obtención de la muestra:**

- Aféresis.

**13.2. Sistema biológico:**

- Sangre periférica.

**13.3. Recipiente:**

- Bolsas para la colección de sangre periférica por aféresis.
- Caseteras para la criopreservación de las células progenitoras hematopoyéticas.

**13.4. Conservación y manejo:**

- Conservación de las células progenitoras hematopoyéticas en Nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

**XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Para desarrollar el procedimiento de criopreservación, congelamiento y almacenamiento de células, cada línea celular, se realizan las siguientes actividades:

**14.1 Recepción y registro de la muestra:**

- 14.1.1 El Biólogo(a) encargado recibe la muestra, bolsa de sangre periférica de la aféresis. Procede a tomar dos alícuotas de 1 ml cada una, un vial es llevado a Hematología para recuento de leucocitos y el otro vial a citometría de flujo para recuento de CD34+.

**14.2 Esterilización de equipos y preparación de material:**

- 14.2.1 Ver DI PC-HC INS 21.

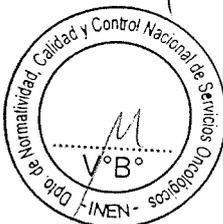
**14.3 Procesamiento de la muestra:**

- 14.3.1 El Biólogo(a) director de proceso, ingresa al área del procedimiento de Criopreservación y dirige el procedimiento dentro de la cabina.
- 14.3.2 El Biólogo(a) circulante interno, ingresa al área del procedimiento de Criopreservación, apoya al director del procedimiento proporcionando materiales estériles, insumos, rotula viales, caseteras, etc.
- 14.3.3 El Biólogo(a) circulante externo, no ingresa al área del procedimiento de criopreservación se mantiene alerta para proporcionar materiales, insumos o información externa relevante en el proceso.
- 14.3.4 El circulante interno, proporciona, al director del procedimiento, guantes estériles, un campo estéril, una pinza estéril, una tijera estéril y un paquete de gases estériles.
- 14.3.5 El director de proceso coloca en campo sobre la cabina de flujo laminar y procederá a colocar ordenadamente al lado izquierdo, la pinza, tijera, y gases.
- 14.3.6 El circulante interno proporciona uno por uno, al director de proceso, tubos tipo Falcón de 50ml, previamente esterilizados.



**PNT.DNCC.INEN.148. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR - 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



- 14.3.7 El director de proceso procede a colocar cada tubo en una gradilla para tubos, que previamente fue colocada dentro de la cabina de flujo laminar.
- 14.3.8 El circulante interno, procede a sellar latubuladuras de la bolsa que contiene las células colectadas, y cortará alguna de ellas dejando únicamente la tubuladura del medio.
- 14.3.9 El circulante interno, agita suavemente la bolsa y se acercará a la cabina, muy cerca al director de proceso.
- 14.3.10 Se procede a verter alcohol sobre la tubuladura de la bolsa.
- 14.3.11 El director de proceso, tomará una gasa y procederá a limpiar la tubuladora de arriba hacia abajo una sola vez y eliminará la gasa, repetir 2 veces.
- 14.3.12 Si el volumen colectado de la suspensión de mononucleares es menor de 30 ml, proceder directamente con el paso del procedimiento de criopreservación según la técnica respectiva.
- 14.3.13 Si la suspensión celular es mayor a 30 ml, proceder a la reducción del volumen centrifugando la bolsa completa o trasvasándola en tubos de 50 ml por 15 minutos a 1800 RPM.
- 14.3.14 El Biólogo(a) circulante externo recoge los resultados de Hematología.
- 14.3.15 Se revisa el conteo de CD 34+ de la bolsa a criopreservar.
- 14.3.16 Calcular el número de bolsas aplicando la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de bolsas} = \frac{RLI \times VCI}{C}$$

- 14.3.17 Luego retirar el excedente de plasma de cada tubo hasta conseguir el volumen deseado.
- 14.3.18 Rotular las bolsas a criopreservar con letra mayúscula, así como las caseteras en donde se colocarán las unidades para almacenar. Datos a rotular: apellidos y nombres del paciente o donante, fecha y tipo de muestra colectada.
- 14.3.19 Homogenizar suavemente el volumen de la suspensión de células que tiene el tubo, luego con una jeringa de 20 ml colocar 30 ml de la suspensión de células en cada bolsa de criopreservación.
- 14.3.20 Preparar la solución criopreservante según la TABLA N° 1 "PORCENTAJE DE USO DE REACTIVOS".

**TABLA N° 1: PORCENTAJE DE USO DE REACTIVOS**

REACTIVO	% (POR BOLSA)
Hanks	50%
Citrato o ACD	10%
Albúmina humana 4% o plasma autólogo	20%
DMSO	20%

**PNT.DNCC.INEN.148. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR - 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

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

**TABLA N° 2: VOLÚMENES DE REACTIVOS**

LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y CRIOPRESERVACION									
NUMERO DE BOLSAS		1	2	3	4	5	6	7	8
SOL HANK'S	cc	26.4	46.2	66	85.8	106	125	145	165
ACD (Citrato)	cc	4	7	10	13	16	19	22	25
ALBUMINA 20%	cc	1.6	2.8	4	5.2	6.4	7.6	8.8	10
DMSO	cc	8	14	20	26	32	38	44	50
<b>VOLUMEN TOTAL</b>		<b>40</b>	<b>70</b>	<b>100</b>	<b>130</b>	<b>160</b>	<b>190</b>	<b>220</b>	<b>250</b>

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

- Si se precipita la albúmina colocar la suspensión criopreservante en la congeladora unos minutos.
- La tabla utiliza albúmina humana al 20%.

14.3.21 El volumen total ideal de cada unidad será de 60 ml (30 mL de la suspensión de CPH y 30 ml de solución criopreservante).

14.3.22 Agregar con una jeringa 20 mL, los 30 ml de solución criopreservante muy lentamente (1 mL por cada minuto) agitando constantemente la bolsa sobre un congelante a fin de mantener la temperatura de 4°C.

**14.4 Preparación y envío de muestra alícuota para el control:**

14.4.1 Retirar el aire de cada unidad, tomar muestras de 1 mL de cada bolsa colocarlos en crio viales para recuento leucocitario.

14.4.2 Para el control de calidad y esterilidad de la muestra criopreservada se alícuota 1 mL y se agrega al medio de cultivo para estudios microbiológicos.

14.4.3 Sellar la bolsa separando 3 alícuotas para control de viabilidad pre – infusión y colocarla junto a la casetera respectiva.

14.4.4 Colocar en el envase con los refrigerantes o hielo a -20°C mientras se termina de procesar todas las bolsas.

**14.5 Criopreservación:**

14.5.1 Poner en marcha el Equipo de Congelación (Cryomed) en el PROGRAMA N°4. Colocar las bolsas en el equipo de congelación (Cryomed) e iniciar la criopreservación programada.

14.5.2 Posteriormente retirar las bolsas del equipo de congelación (Cryomed) y colocarlas en el Tanque de nitrógeno líquido a -196°C.

**14.6 Registro de datos:**

14.6.1 Tener un registro de la ubicación de las caseteras de cada colecta en el tanque de nitrógeno líquido.

**PNT.DNCC.INEN.148. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR - 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

- 14.6.2 Enviar las alícuotas respectivas, para el recuento celular y el control de esterilidad (microbiología).
- 14.6.3 Registrar todos los datos del procedimiento realizado según el Protocolo de trabajo y archivar todos los informes de cada colecta.

**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 del Equipo Funcional de Patología Clínica.

**XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS****16.1 Rango de valores a informar:**

Sub análisis 1: CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR.

- Texto

**16.2 Rangos de alarma:**

Sub análisis 1: CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR

- No aplica

**16.3 Intervalos de referencia:**

Sub análisis 1: Sub análisis 1: CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR

- No aplica

**XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Beck, S., Geraghty, D., Inoko, H., & Rowen, L. (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401(6756), 921-923.
- Delorson, K. (s.f.). *Histocompatibilidad e Inmunogenética*. United Kingdom.
- Echeverría Velásquez, M. (2012). Análisis de la asociación entre alelos hla clase ii y leucemia en población mestiza venezolana. potenciales implicaciones patogénicas. análisis de la asociación entre alelos HLA clase ii y leucemia en población mestiza venezolana. *Potenciales implicaciones patogénicas*. Alcalá de Henares.
- Jones, Y. E., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. (2006). MHC Class II proteins and disease: a structural perspective. *Nature Reviews Immunology*, 271-282.
- Neefjes, J., Jongasma, M. L., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 11, 823-836.
- Manual del Usuario Software HLA FusioTM. ONE LAMBDA INC.



**PNT.DNCC.INEN.148. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE CRIOPRESERVACIÓN, CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS, CADA LÍNEA CELULAR - 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

**XVIII. ANEXOS**

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

**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 5 (1 año) / sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años
DI PC-HC REG 29	CUADERNO DE REGISTRO DE CRIOPRESERVACIÓN	Estante documentos Sector 4 (1 año) / Sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del Área de Trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años

**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- 11	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 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).</li> <li>- Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.</li> </ul>	25/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael



**PNT.DNCC. INEN.149. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PREPARACIÓN DE TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS, CRIOPRESERVACIÓN 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 PREPARACIÓN DE TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS, CRIOPRESERVACIÓN****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Preparación de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas, Criopreservación.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 38207
- Código Tarifario INEN: 240205

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para la Preparación de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas, Criopreservación; 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, y emitir los resultados de análisis.
- Biólogo/a del Grupo de trabajo criopreservación del área de trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de realizar el procedimiento establecido en este documento normativo.
- Personal administrativo/a 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**

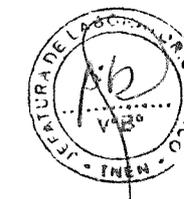
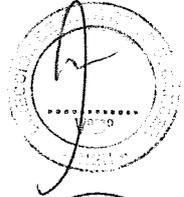
- Ver Manual de Terminología del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC del Equipo Funcional de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).

**VI. LINEAMIENTOS**

- Los reactivos, a excepción del Dimetilsulfóxido (DMSO), deben mantenerse a 4° C, al momento de la preparación debe colocarse el frasco de preparación dentro de una cubeta de acero inoxidable en baño de hielo, para evitarla la precipitación de la albúmina.

**VII. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

La preparación de progenitores hematopoyéticos tiene como objetivo su empleo en el trasplante de progenitores hematopoyéticos. En la etapa de descongelación la supervivencia celular, puede comprometerse por lisis osmótica, recristalización intracelular o por efectos tóxicos del crioprotector. Leibo y cols. en 1970 (1), demostraron que la recuperación de células hematopoyética, era superior si la velocidad de descongelación era rápida, a 100°C/minuto, disminuyendo los riesgos de cristalización intracelular y choque hipotérmico (2).



**PNT.DNCC. INEN.149. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PREPARACIÓN DE TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS  
HEMATOPOYÉTICAS, CRIOPRESERVACIÓN 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**VIII. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA**

Actualmente se han desarrollado protocolos de congelación ultrarrápida-descongelación rápida, utilizando altas concentraciones de crioprotectores previniendo así la formación de cristales de hielo y la inducción de un medio amorfo y vítreo (3). Las bajas temperaturas (asociadas al aumento de la rigidez de la membrana) y la rapidez (décimas de segundo) con la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hacen muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana mediante procesos de transporte activo (dependientes de ATP), la disminución de temperatura desde 25 °C a 10 °C reduce en un 60% la actividad de las bombas dependientes de ATP y la difusión facilitada o como transporte (transporte concomitante de dos moléculas a través de la membrana dependiente una de ellas de ATP y/o iones H<sup>+</sup>), en consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico (4). Los productos criopreservados se deben almacenar a temperaturas desde -133°C (vapores de nitrógeno líquido) a -196 °C (nitrógeno líquido). A estas temperaturas no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas y por tanto las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a temperaturas bajas sino de los procesos de congelación y descongelación. La lesión celular crio inducida se explica en función de la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación, Merryman propone la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la congelación (choque osmótico) (5), el volumen celular mínimo se basa en que el volumen se reduce en relación al aumento de la osmolaridad extracelular, a medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad, en este caso los crioprotectores actuarían reduciendo por sus propiedades coligativas la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada (6).

**IX. 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) del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC del Equipo Funcional de Patología Clínica.

**X. EQUIPAMIENTO****10.1 Equipos (médico, biomédico, electromecánico, informático):**

- Cámara de flujo laminar
- Congeladora eléctrica vertical hasta -80°C
- Equipo de baño maría
- Tanque para nitrógeno líquido
- Tanque para almacenamiento de células
- Termómetro
- Envase de capacidad refrigerante

**10.2 Instrumentales:**

- Cronómetro digital



**PNT.DNCC. INEN.149. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PREPARACIÓN DE TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS, CRIOPRESERVACIÓN 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

- Guante criogénico talla M

**10.3 Mobiliario:**

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Mesa de metal
- Rack para televisor de 21 In
- Módulo de melamina para computadora de 90 Cm X 98 Cm X 50 Cm
- Coche metálico para transporte en general

**10.4 Software:**

- No aplica.

**XI. SUMINISTROS**

**11.1 Insumos y material:**

- Campo estéril
- Hielo gel refrigerante
- Gasas estériles.
- Gorro descartable unisex x 100 unidades
- Guante para examen descartable talla M x 100 unidades
- Mandil descartable estéril talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica de 3 pliegues
- Hielo en cubo x 3 kg

**11.2 Reactivos:**

- Agua destilada

**XII. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS**

**12.1 Servicios Técnicos:**

**Mantenimiento preventivo y correctivo de equipamiento:**

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

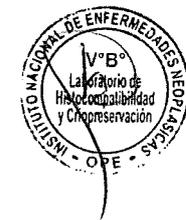
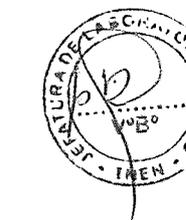
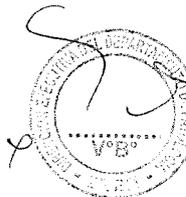
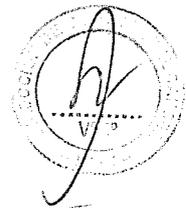
**12.2 Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono/Internet

**XIII. MUESTRA**

**13.1. Obtención de la muestra:**

- Aféresis.



**PNT.DNCC. INEN.149. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PREPARACIÓN DE TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS, CRIOPRESERVACIÓN 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

**13.2. Sistema biológico:**

- Sangre periférica.

**13.3. Recipiente:**

- Bolsas para la colección de sangre periférica por aféresis.
- Caseteras para la criopreservación de las células progenitoras hematopoyéticas.

**13.4. Conservación y manejo:**

- Conservación de las células progenitoras hematopoyéticas en Nitrógeno líquido a -196 °C.

**XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Para desarrollar el procedimiento de preparación de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, criopreservación; se realizan las siguientes actividades:

**14.1 Esterilización de equipos y preparación de material:**

- 14.1.1 Ver DI PC-HC INS 21.

**14.2 Procesamiento de la muestra:**

- 14.2.1 Ubicar lugar de las caseteras en el DI PC HC REG 29 y retirar las caseteras de aluminio que albergan las bolsas criogénicas las cuales contienen los progenitores hematopoyéticos, (tanto caseteras como bolsas criogénicas están debidamente rotuladas con el nombre del paciente y/o donante), y se encuentran dentro de en un tanque de almacenamiento suministrado con nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C.

- 14.2.2 Colocar las caseteras retiradas dentro de un envase con capacidad refrigerante junto con geles refrigerantes congelados previamente a -80 °C, para su transporte hasta la Unidad de Trasplantes.

**14.3 Descongelación de muestra:**

- 14.3.1 Colocar las caseteras retiradas dentro de un envase con capacidad refrigerante junto con geles refrigerantes congelados previamente a -80 °C, para su transporte hasta la Unidad de Trasplantes.

- 14.3.2 En el ambiente dispuesto para la infusión o re-infusión de Progenitores Hematopoyéticos se tendrá el equipo de baño maría con agua estéril a una temperatura fluctuante entre 37 °C a 40 °C\*\*. La preparación del equipo deberá ser realizada un día previo a la infusión. Este procedimiento requiere la limpieza profunda del equipo y el coche metálico para su traslado. Asimismo, se debe desinfectar los contenedores de agua destilada, el formato de Infusión de Progenitores Hematopoyéticos (Ver ANEXOS), lapicero, cronómetro y termómetro.

- 14.3.3 Cuando el paciente se encuentre preparado para la infusión, el profesional de Enfermería y/o Médico responsable del proceso comunica para empezar el descongelamiento de los progenitores hematopoyéticos en el baño maría.

- 14.3.4 Para esto, se retira la casetera del envase refrigerante y se coloca en dentro del agua que se encuentra a la temperatura adecuada y se agita suavemente la unidad hasta su descongelación.

**PNT.DNCC. INEN.149. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PREPARACIÓN DE TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS  
HEMATOPOYÉTICAS, CRIOPRESERVACIÓN 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

- 14.3.5 El tiempo será cronometrado por el personal de apoyo que avisa cuando se cumplan dos minutos de estar sumergidas en el agua del baño maría, tiempo en el que se habrán descongelado.
- 14.3.6 Secar la unidad con una gasa estéril y entregarla al profesional que se encargará de realizar la infusión al paciente.
- 14.3.7 Proceder del mismo modo con las otras unidades crio preservadas.
- 14.3.8 Realizar un informe del procedimiento realizado.
- 14.3.9 Actualizar la información referente al espacio de almacenamiento de las caseteras.

**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 del Equipo Funcional de Patología Clínica.

**XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS****16.1 Rango de valores a informar:**Sub análisis 1: Viabilidad celular

- Numérico.

**16.2 Rangos de alarma:**Sub análisis 1: Viabilidad celular

- Por debajo del 60%.

**16.3 Intervalos de referencia:**Sub análisis 1: Viabilidad celular

0-100%.

**XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Beck, S., Geraghty, D., Inoko, H., & Rowen, L. (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401(6756), 921-923.
2. Delorsón, K. (s.f.). *Histocompatibilidad e Inmunogenética*. United Kingdom.
3. Echeverría Velásquez, M. (2012). Análisis de la asociación entre alelos hla clase ii y leucemia en población mestiza venezolana. potenciales implicaciones patogénicas. análisis de la asociación entre alelos HLA clase ii y leucemia en población mestiza venezolana. *Potenciales implicaciones patogénicas*. Alcalá de Henares.
4. Jones, Y. E., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. (2006). MHC Class II proteins and disease: a structural perspective. *Nature Reviews Immunology*, 271-282.
5. Neefjes, J., Jongsmá, M. L., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 11, 823-836.



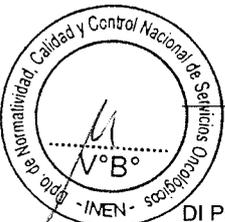
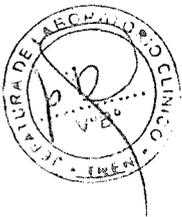
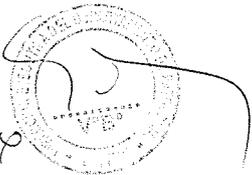
**PNT.DNCC. INEN.149. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PREPARACIÓN DE TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS, CRIOPRESERVACIÓN V.01**

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

6. Manual del Usuario Software HLA FusioTM. ONE LAMBDA INC.

**XVIII. ANEXOS**

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





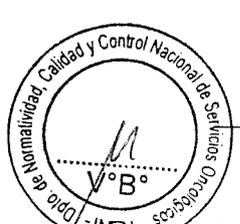
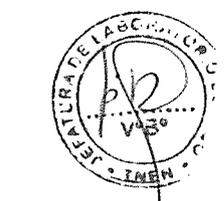
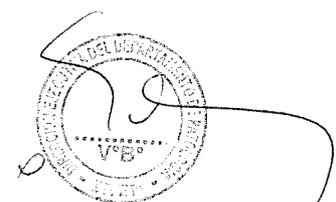
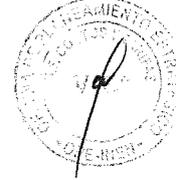
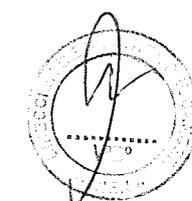
**PNT.DNCC. INEN.149. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PREPARACIÓN DE TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS, CRIOPRESERVACIÓN V.01**

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° 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 año) / sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del área de trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años
DI PC-HC REG 29	CUADERNO DE REGISTRO DE CRIOPRESERVACIÓN	Estante documentos Sector 4 (1 año) / Sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del área de trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años



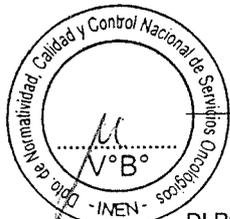
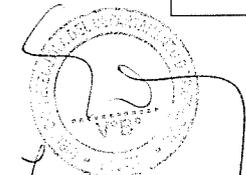
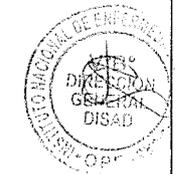
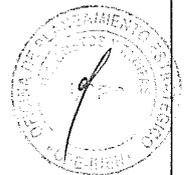
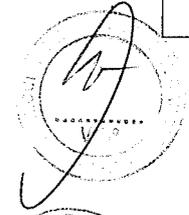


**PNT.DNCC. INEN.149. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PREPARACIÓN DE TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS, CRIOPRESERVACIÓN V.01**  
 Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
 Departamento de Patología - Equipo Funcional de Patología Clínica - Área de Trabajo 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 - 8	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se elabora PNT según D.A 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).</li> <li>- Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.</li> </ul>	25/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael





**PNT.DNCC. INEN.150. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MANTENIMIENTO DE UNA BOLSA DE CÉLULAS CRIOPRESERVADAS DURANTE 30  
DÍAS 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 MANTENIMIENTO DE UNA  
BOLSA DE CÉLULAS CRIOPRESERVADAS DURANTE 30 DÍAS**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Mantenimiento de una Bolsa de Células Criopreservadas durante 30 días.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSa): 88240.02
- Código Tarifario INEN: 240206

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para mantenimiento de una bolsa de células criopreservadas durante 30 días; 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, y emitir los resultados de análisis.
- Biólogo/a del grupo de trabajo criopreservación del área de trabajo Laboratorio de Histocompatibilidad y Criopreservación: se encarga de realizar el procedimiento establecido en este documento normativo.
- Personal administrativo/a 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**

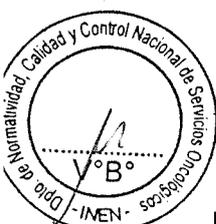
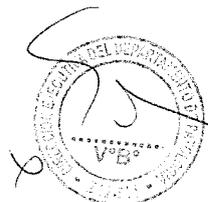
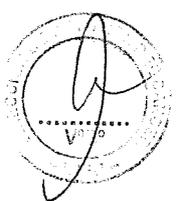
- Ver Manual de Terminología del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC del Equipo Funcional de Patología Clínica (DI PC-PC MAN 03).

**VI. LINEAMIENTOS**

- Los reactivos, a excepción del Dimetilsulfóxido (DMSO), deben mantenerse a 4° C, al momento de la preparación debe colocarse el frasco de preparación dentro de una cubeta de acero inoxidable en baño de hielo, para evitarla la precipitación de la albúmina (1).

**VII. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

La criopreservación a baja temperatura (-196° C), tiene por objeto bloquear de una forma total los sistemas enzimáticos celulares permitiendo (2), teóricamente, su conservación indefinida. Siempre que el almacenamiento se mantenga a una temperatura estable, es decir, se realice el mantenimiento de las bolsas criopreservadas, no interfiere en la viabilidad de las células, más si ésta es a -196 °C en nitrógeno líquido (3).



**PNT.DNCC. INEN.150. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MANTENIMIENTO DE UNA BOLSA DE CÉLULAS CRIOPRESERVADAS DURANTE 30  
DÍAS 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

**VIII. PRINCIPIO DE LA PRUEBA ANALÍTICA**

Los productos criopreservados se deben almacenar a temperaturas desde  $-133\text{ }^{\circ}\text{C}$  (vapores de nitrógeno líquido) a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (nitrógeno líquido). A estas temperaturas no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas y por tanto las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a temperaturas bajas sino de los procesos de congelación y descongelación (4). La lesión celular crio inducida se explica en función de la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación, Merryman propone la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la congelación (choque osmótico) (5), el volumen celular mínimo se basa en que el volumen se reduce en relación al aumento de la osmolaridad extracelular, a medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad, en este caso los crioprotectores actuarían reduciendo por sus propiedades coligativas la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada (6).

**IX. 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) del Sistema de Gestión de la Calidad – SGC del Equipo Funcional de Patología Clínica.

**X. EQUIPAMIENTO****10.1 Equipos (médico, biomédico, electromecánico, informático):**

- Congeladora eléctrica vertical hasta  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Equipo de baño maría
- Tanque para nitrógeno líquido
- Tanque para almacenamiento de células
- Termómetro
- Envase de capacidad refrigerante
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo
- 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:**

- Cronómetro digital
- Guante criogénico talla M

**PNT.DNCC. INEN.150. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MANTENIMIENTO DE UNA BOLSA DE CÉLULAS CRIOPRESERVADAS DURANTE 30  
DÍAS 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**10.3 Mobiliario:**

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Mesa de metal
- Módulo de melamina
- Coche metálico para transporte en general

**10.4 Software:**

- No aplica.

**XI. SUMINISTROS****11.1 Insumos y material:**

- Campo estéril
- Hielo gel refrigerante
- Gasas estériles.
- Guante criogénico talla M
- Papel Bond 75 g Tamaño A4
- Tóner de impresión para hp cod. ref. 05X Ce505X Negro
- Bolígrafo (lapicero) de tinta líquida punta fina color azul
- Cuaderno empastado rayado tamaño A5 x 200 hojas
- Gorro descartable unisex x 100 unidades
- Guante para examen descartable talla M x 100 unidades
- Mandil descartable estéril talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica de 3 pliegues

**11.2 Reactivos:**

- Nitrógeno líquido

**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

**PNT.DNCC. INEN.150. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MANTENIMIENTO DE UNA BOLSA DE CÉLULAS CRIOPRESERVADAS DURANTE 30  
DÍAS 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

**XIII. MUESTRA****13.1. Obtención de la muestra:**

- Aféresis.

**13.2. Sistema biológico:**

- Sangre periférica.

**13.3. Recipiente:**

- Bolsas para la colección de sangre periférica por aféresis.
- Caseteras para la criopreservación de las células progenitoras hematopoyéticas.

**13.4. Conservación y manejo:**

- Conservación de las células progenitoras hematopoyéticas en Nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

**XIV. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Para desarrollar el procedimiento de mantenimiento de una bolsa de células criopreservadas durante 30 días, se realizan las siguientes actividades:

**14.1 Revisión de la base de datos del tanque de  $\text{N}_{21}$** 

- 14.1.1 Buscar en la base de datos de registro de criopreservaciones el número de bolsas crio preservadas en los últimos 30 días.

**14.2 Revisión del tanque de  $\text{N}_{21}$** 

- 14.2.1 Ubicar lugar de las caseteras en el DI PC HC REG 29 que se encuentran dentro de en un tanque de almacenamiento suministrado con nitrógeno líquido a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ .

**14.3 Mantención de Progenitores Hematopoyéticos**

- 14.3.1 Revisar los niveles de  $\text{N}_{21}$

**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 del Equipo Funcional de Patología Clínica.

**XVI. RESULTADOS ANALÍTICOS****16.1 Rango de valores a informar:**

Sub análisis 1: Mantenimiento de una bolsa de células criopreservadas durante 30 días

- Numérico (Temperatura del tanque).

**16.2 Rangos de alarma:**

Sub análisis 1: Mantenimiento de una bolsa de células criopreservadas durante 30 días

- Temperaturas superiores a  $-190^{\circ}\text{C}$ .



**PNT.DNCC. INEN.150. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MANTENIMIENTO DE UNA BOLSA DE CÉLULAS CRIOPRESERVADAS DURANTE 30 DÍAS 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

**16.3 Intervalos de referencia:**

Sub análisis 1: Mantenimiento de una bolsa de células criopreservadas durante 30 días

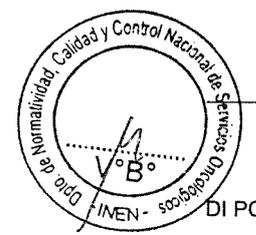
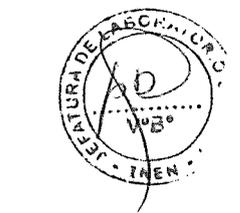
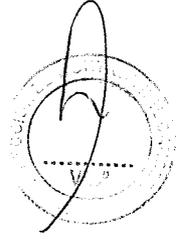
- Temperaturas entre 0 y -196 °C.

**XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Beck, S., Geraghty, D., Inoko, H., & Rowen, L. (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401(6756), 921-923.
2. Delorsen, K. (s.f.). *Histocompatibilidad e Inmunogenética*. United Kingdom.
3. Echeverría Velásquez, M. (2012). Análisis de la asociación entre alelos hla clase ii y leucemia en población mestiza venezolana. potenciales implicaciones patogénicas. Análisis de la asociación entre alelos HLA clase ii y leucemia en población mestiza venezolana. Potenciales implicaciones patogénicas. Alcalá de Henares.
4. Jones, Y. E., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. (2006). MHC Class II proteins and disease: a structural perspective. *Nature Reviews Immunology*, 271-282.
5. Neeffjes, J., Jongsma, M. L., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 11, 823-836.
6. Manual del Usuario Software HLA FusioTM. ONE LAMBDA INC.

**XVIII. ANEXOS**

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





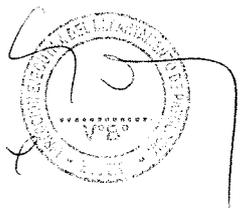
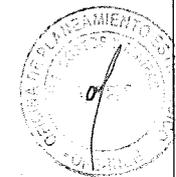
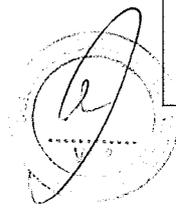
### PNT.DNCC. INEN.150. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MANTENIMIENTO DE UNA BOLSA DE CÉLULAS CRIOPRESERVADAS DURANTE 30 DÍAS V.01

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° 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 año) / sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del área de trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años
DI PC-HC REG 29	CUADERNO DE REGISTRO DE CRIOPRESERVACIÓN	Estante documentos Sector 4 (1 año) / Sector de almacenamiento 1 (1 año)	Encargado del área de trabajo Laboratorio Histocompatibilidad y Criopreservación	2 años





**PNT.DNCC. INEN.150. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MANTENIMIENTO DE UNA BOLSA DE CÉLULAS CRIOPRESERVADAS DURANTE 30 DÍAS 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**

VERSION	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 - 7	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se elabora PNT según D.A 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).</li> <li>- Asignación de nuevo documento por implementación de código tarifario.</li> </ul>	25/08/2020	M.C. Roxana Regalado Rafael

