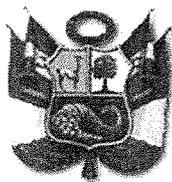


REPUBLICA DEL PERU



RESOLUCION JEFATURAL

Lima, 10 de MARZO de 2020

VISTOS:

El Informe N° 042-2020-DICON/INEN, de la Dirección de Control de Cáncer, el Memorando N° 124-2020-OGPP/INEN de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto y el Informe N° 257-2020-OAJ/INEN de la Oficina de Asesoría Jurídica; y,

CONSIDERANDO:

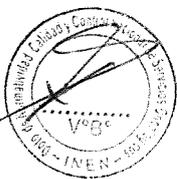
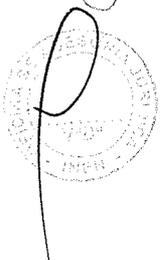
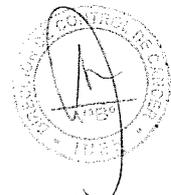
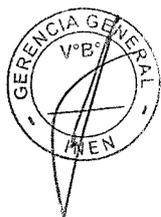
Que a través de la Ley N° 28748, se creó como Organismo Público Descentralizado al Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas - INEN, con personería jurídica de derecho público interno, con autonomía económica, financiera, administrativa y normativa, adscrito al Sector Salud, constituyendo Pliego 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, Informe N° 042-2020-DICON/INEN, la Dirección de Control de Cáncer, remite el Memorando N° 124-2020-OGPP/INEN, de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto, con el cual alcanza los Informes N° 008-2020-00-OGPP/INEN elaborado por la Oficina de Organización y el Informe N° 110-2020-OPE-OGPP/INEN elaborado por la Oficina de Planeamiento Estratégico, mediante el cual emiten opinión favorable con respecto a los veinte (20) proyectos de Procedimientos Normalizados de Trabajo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular Tomo I, para la revisión y validación que tiene el siguiente contenido;

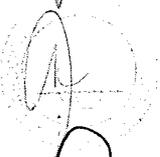
Que, de la revisión efectuada del Documento Normativo en cuestión elaborado por el Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, se aprecia que cumple con la estructura mínima señalada en la Directiva Administrativa N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la 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 del "Procedimientos Normalizados de Trabajo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular Tomo I", 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, Ley N° 30518 - Ley de Presupuesto del Sector Público para el Año Fiscal 2019, y la Resolución Suprema N° 011-2018-SA;



SE RESUELVE:

ARTÍCULO PRIMERO.- APROBAR el Procedimientos Normalizados de Trabajo siguiente, que en anexo forma parte integrante de la presente resolución.

- “Procedimientos Normalizados de Trabajo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular Tomo I”.



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 DEL EQUIPO FUNCIONAL DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TOMO I

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular



Elaborado por:	- M.C. Analí Pamela Mora Alferez	Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular. Departamento de Patología.
Revisado y validado por:	- Lic. Angel Riquez Quispe - Bach. Sharon Flores Salazar	Oficina de Organización. Oficina General de Planeamiento y Presupuesto
Revisado y aprobado por	- M.C. Odorico Iván Belzusrri Padilla - M.C. Carmela Barrantes Serrano - Lic. Yoseline Azarán Isla	Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos



CONTENIDO

- PNT. DNCC.INEN.001. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN E2A/PBX1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1.
- PNT.DNCC.INEN.002. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN MLL/AF4 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN.003. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN TEL/AML1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1
- PNT.DNCC.INEN.004. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN AML1/ETO V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN. 005. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CBFβ/MYH11 V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN. 006. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PML/RARα V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN.007. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PLZF/RARα V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN.008. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN DEK/CAN V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN.009 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN F1P1L1/PDGFRα V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN 010. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN SIL/TAL V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN 011. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p190 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN 012. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p210 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN 013. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p210 V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN 014. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p190 V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN 015. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARα bcr1 V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN 016. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARα bcr2 V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN 017. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARα bcr3 V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN 018. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN AML1/ETO TÉCNICA PCR EN TIEMPO REAL V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN 019. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CBFβ/MYH11 V 0.1.
- PNT.DNCC. INEN 020. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL MOLECULAR LEUCEMIAS LINFÁTICAS AGUDAS – CÉLULA B X PCR V 0.1.



**PNT.DNCC. INEN.001. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN E2A/PBX1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

DETECCIÓN DEL GEN E2A/PBX1 POR PCR EN TIEMPO FINAL**I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección del gen E2A/PBX1 por PCR en tiempo final.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –

- Código CPMS (MINSa): 88299.18
- Código Tarifario INEN: 210717

III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección del gen E2A/PBX1 por PCR en tiempo final, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

IV. RESPONSABILIDADES. –

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.

V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.

**PNT.DNCC. INEN.001. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN E2A/PBX1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminotetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet. - Pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

Prueba utilizada para diagnóstico y gradación de riesgo (pronóstico) de leucemias agudas de estirpe linfocítica en pacientes pediátricos y adultos; según guías actuales internacionales (1).

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). -**

- Cámara de Flujo Laminar, clase II
- Centrifuga para tubos (02)
- Vortex
- Microcentrifuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal

**PNT.DNCC. INEN.001. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN E2A/PBX1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20In
- Unidad de central de proceso –CPU de 3.1Ghz
- Teclado- Keyboard con puerto USB
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- CPU Intel core i7-477
- Impresora láser

**7.2 Instrumentales. -**

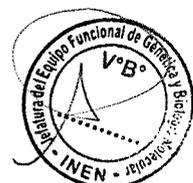
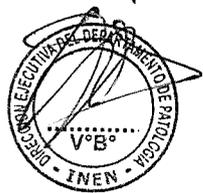
- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200ul
- Micropipeta volumen variable 2 ul - 20ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul - 20ul

**7.3 Mobiliario. -**

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

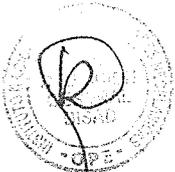
**VIII. SUMINISTROS. -****8.1 Insumos y material médico. -**

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para Xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml



**PNT.DNCC. INEN.001. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN E2A/PBX1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular



- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla m
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Gorro descartable de enfermera
- Reactivo para extracción de ARN x 100 ml
- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 ml
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 l
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Agua para PCR x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para ARN para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Primers específicos según gene de fusión a estudiar
- Enzima taq hot start DNA polimerasa (5u/ul) x 1000 u
- Deoxinucleótidos Dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno 200 µl para PCR con tapa plana x 1000
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 ul
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000x x 200 ul
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer de carga 6x x 1 ml
- Tips 0.5 ul -10 ul x 500

IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –**Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos



**PNT.DNCC. INEN.001. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN E2A/PBX1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

X. MUESTRA. –**❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN).

❖ RECIENTE:

- Sangre venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

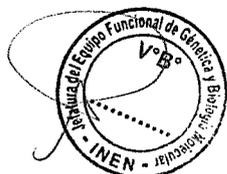
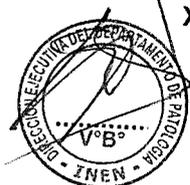
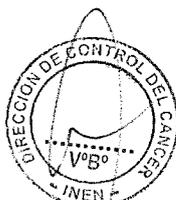
Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (2) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1. Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2. Registro de la muestra:

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.



**PNT.DNCC. INEN.001. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN E2A/PBX1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.3. Procesamiento de la muestra:**

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o medula ósea.

**11.4. Separación de linfocitos:**

Aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/MI, con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad.

**11.5. Extracción y cuantificación de ARN:**

Se usa la metodología trizol-cloformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

**11.6. Transformación de ARN en molécula de cADN:**

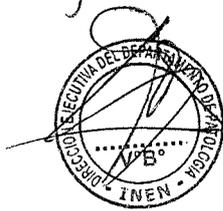
Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.7. Amplificación:

Se prepara el proceso de PCR convencional, identificando el gen de fusión a estudiar por medio del uso de primers específicos para el gen de fusión E2A/PBX1, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

**11.8. Preparación de gel:**

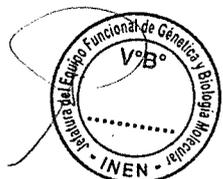
Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos ayudará a analizar el amplicón (producto obtenido del proceso de la amplificación), por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

**11.9. Análisis de resultado:**

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia del gen de fusión (bandas de peso molecular específicos para el gen de fusión E2A/PBX1) según bibliografía (2) y protocolos internos.

11.10. Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.





PNT.DNCC. INEN.001. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN E2A/PBX1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

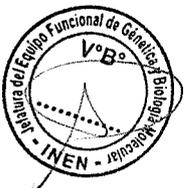
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 19 de mayo de 2016; 127(20):2391-405.
2. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. diciembre de 1999; 13(12):1901.



XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras





PERÚ

Sector Salud

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

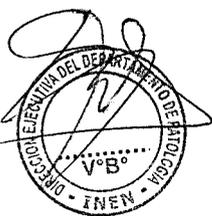
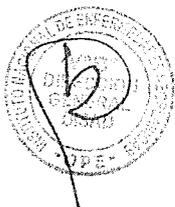


PNT.DNCC. INEN.001. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN E2A/PBX1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: 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	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	5/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN.002. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN MLL/AF4 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

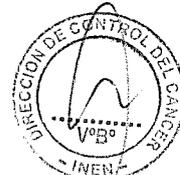
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

DETECCIÓN DEL GEN MLL/AF4 POR PCR EN TIEMPO FINAL**I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección del Gen MLL/AF4 por PCR en tiempo final.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –**

- Código CPMS (MINSA): 88299.16
- Código Tarifario INEN: 210718

**III. ALCANCE. –**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección del gen MLL/AF4, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

**IV. RESPONSABILIDADES. –**

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.

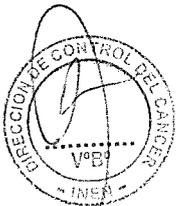
**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.



**PNT.DNCC. INEN.002. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN MLL/AF4 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

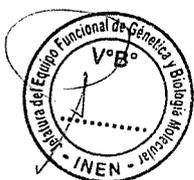
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminetetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –**

Prueba utilizada para diagnóstico y gradación de riesgo (pronóstico) de leucemias agudas de estirpe linfóide en pacientes pediátricos y adultos; según guías actuales internacionales (1).

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, elecromecánico, informático). –**

- Cámara de Flujo Laminar, clase II
- Centrifuga para tubos (02)
- Vortex
- Microcentrifuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador



**PNT.DNCC. INEN.002. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN MLL/AF4 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20In
- Unidad de central de proceso –CPU de 3.1Ghz
- Teclado- Keyboard con puerto USB
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- CPU intercore i7-477
- Impresora láser

7.2 Instrumentales. –

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

7.3 Mobiliario. –

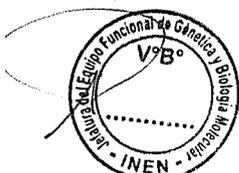
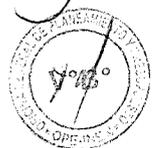
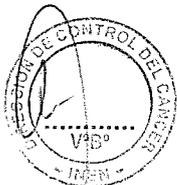
- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melamina
- Módulo de melamina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

**PNT.DNCC. INEN.002. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN MLL/AF4 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

VIII. SUMINISTROS. –**8.1 Insumos y material médico:**

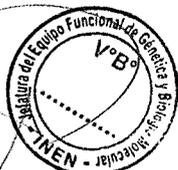
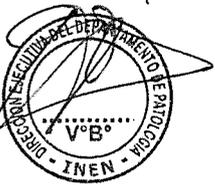
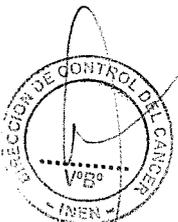
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de drill manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de drill para dama manga larga talla S
- Chaqueta de drill manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de drill manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla m
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Gorro descartable de enfermera
- Reactivo para extracción de ARN x 100 ml
- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 ml
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml



**PNT.DNCC. INEN.002. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN MLL/AF4 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 l
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para ARN para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Primers específicos según gene de fusión a estudiar
- Enzima taq hot start dna polimerasa (5u/ul) x 1000 u
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno 200 µl para PCR con tapa plana x 1000
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 ul
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000x x 200 ul
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer de carga 6x x 1 ml
- Tips 0.5 ul -10 ul x 500



**PNT.DNCC. INEN.002. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN MLL/AF4 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –**Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

**Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

X. MUESTRA. –**❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

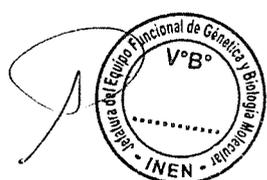
- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (2) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).



**PNT.DNCC. INEN.002. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN MLL/AF4 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.2 Registro de la muestra:**

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

11.3 Procesamiento de la muestra:

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o medula ósea

11.4 Separación de linfocitos:

Aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/MI. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad.

11.5 Extracción y cuantificación de ARN:

Se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

11.6 Transformación de ARN en molécula de cADN:

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.7 Amplificación:

Se prepara el proceso de PCR convencional, identificando el gen de fusión a estudiar por medio del uso de primers específicos para el gen de fusión MLL/AF4, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

11.8 Preparación de gel:

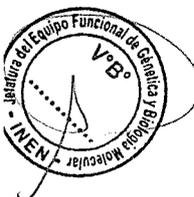
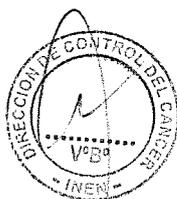
Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos ayudará a analizar el amplicón (producto obtenido del proceso de la amplificación) por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

11.9 Análisis de resultado:

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia del gen de fusión (bandas de peso molecular específicos para el gen de fusión MLL/AF4) según bibliografía (2) y protocolos internos.

11.10 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes





PNT.DNCC. INEN.002. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN MLL/AF4 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

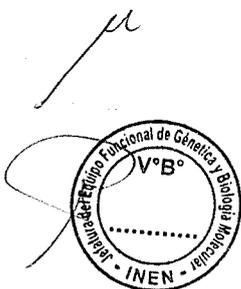
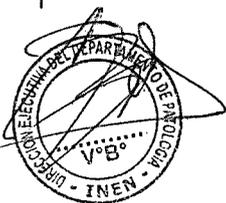
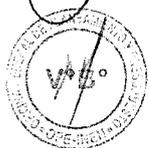
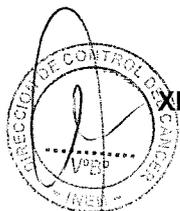
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 19 de mayo de 2016; 127(20):2391-405.
2. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. diciembre de 1999; 13(12):1901.



XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras



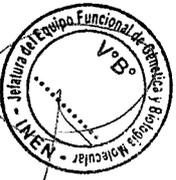
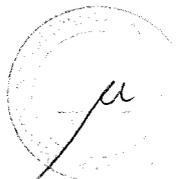
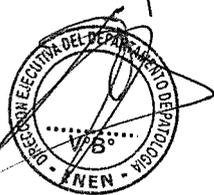
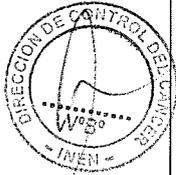


PNT.DNCC. INEN.002. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN MLL/AF4 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: 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	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN.003. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN TEL/AML1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN DEL GEN TEL/AML1 POR PCR EN TIEMPO FINAL****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección del gen TEL/AML1 por PCR en tiempo final.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –**

- Código CPMS (MINSA): 88299.01
- Código Tarifario INEN: 210721

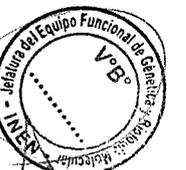
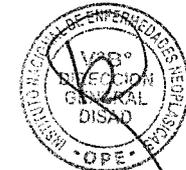
**III. ALCANCE. –**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección del gen TEL/AML1, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

**IV. RESPONSABILIDADES. –**

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.



**PNT.DNCC. INEN.003. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN TEL/AML1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminotetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de transmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

Prueba utilizada para diagnóstico y gradación de riesgo (pronóstico) de leucemias agudas de estirpe linfóide en pacientes pediátricos y adultos; según guías actuales internacionales (1).

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos (02)
- Vortex

**PNT.DNCC. INEN.003. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN TEL/AML1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Microcentrífuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20In
- Unidad de central de proceso –cpu de 3.1ghz
- Teclado- keyboard con puerto usb
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser

7.2 Instrumentales. –

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

7.3 Mobiliario. –

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos

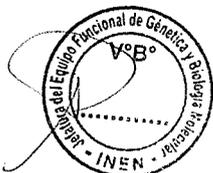
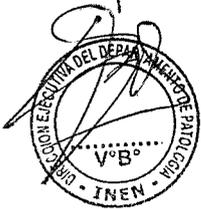
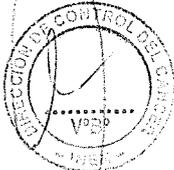
**PNT.DNCC. INEN.003. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN TEL/AML1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

**VIII. SUMINISTROS. –****8.1 Insumos y material médico:**

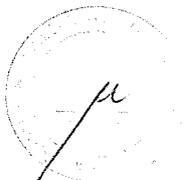
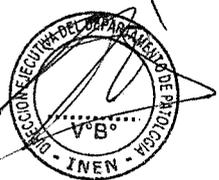
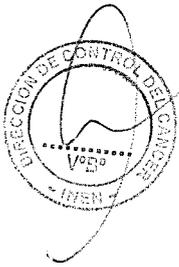
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° X 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 G
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g X 1 In
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con Edta
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño a4 (2)
- Tóner de impresión para Xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla m
- Tacho de plástico 25 l aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L



**PNT.DNCC. INEN.003. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN TEL/AML1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Gorro descartable de enfermera
- Reactivo para extracción de ARN x 100 ml
- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 ml
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para ARN para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Primers específicos según gene de fusión a estudiar
- Enzima taq hot start dna polimerasa (5u/ul) x 1000 u
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno 200 µl para PCR con tapa plana x 1000
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 ul
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000x x 200 ul
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer de carga 6x x 1 ml
- Tips 0.5 ul -10 ul x 500



**PNT.DNCC. INEN.003. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN TEL/AML1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

X. MUESTRA. –**❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (2) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de

**PNT.DNCC. INEN.003. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN TEL/AML1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

11.3 Procesamiento de la muestra:

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o médula ósea.

11.4 Separación de linfocitos:

Aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/MI. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad.

11.5 Extracción y cuantificación de ARN:

Se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

11.6 Transformación de ARN en molécula de cADN:

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.7 Amplificación:

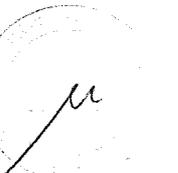
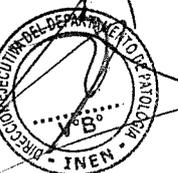
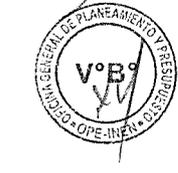
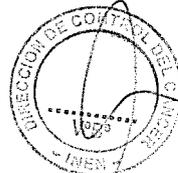
Se prepara el proceso de PCR convencional, identificando el gen de fusión a estudiar por medio del uso de primers específicos para el gen de fusión TEL/AML1, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

11.8 Preparación de gel:

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos ayudara a analizar el amplicón (producto obtenido del proceso de la amplificación) por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

11.9 Análisis de resultado:

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia del gen de fusión (bandas de peso molecular específicos para el gen de fusión TEL/AML1) según bibliografía (2) y protocolos internos.





PNT.DNCC. INEN.003. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN TEL/AML1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

11.10 Elaboración y entrega de Resultado:

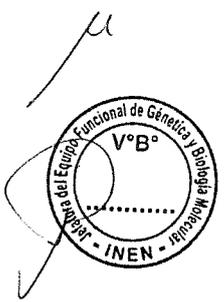
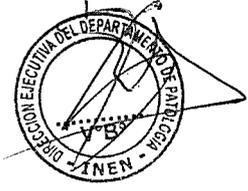
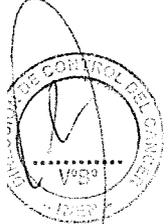
El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 19 de mayo de 2016; 127(20):2391-405.
2. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. diciembre de 1999; 13(12):1901.

XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras



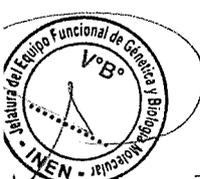
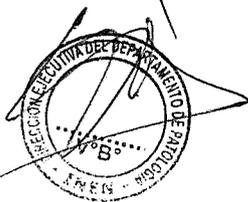
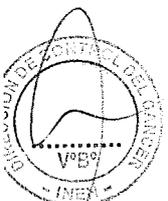


PNT.DNCC. INEN.003. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN TEL/AML1 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: 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	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN.004. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN AML1/ETO V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN AML1/ETO****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección del gen de fusión AML1/ETO por PCR en tiempo final.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –

- Código CPMS (MINSa): 81206.03
- Código Tarifario INEN: 210701

III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección del gen fusión AML1/ETO, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido

IV. RESPONSABILIDADES. –

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.

**PNT.DNCC. INEN.004. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN AML1/ETO V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminetetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

Prueba utilizada para estudio de gen de fusión utilizado para diagnóstico y gradación de riesgo (pronóstico) de leucemias agudas de estirpe mieloide no promielocítica en pacientes pediátricos y adultos, según guías actuales internacionales. (1)

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos (02)
- Vortex

**PNT.DNCC. INEN.004. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN AML1/ETO V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Microcentrífuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20In
- Unidad de central de proceso –cpu de 3.1ghz
- Teclado- keyboard con puerto usb
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser

7.2 Instrumentales. –

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

7.3 Mobiliario. –

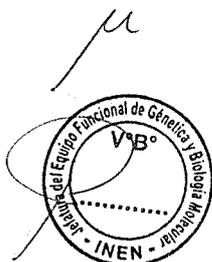
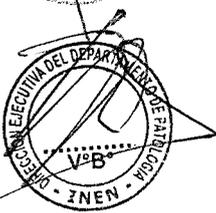
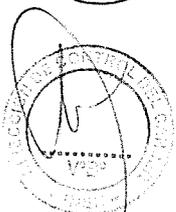
- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos

**PNT.DNCC. INEN.004. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN AML1/ETO V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

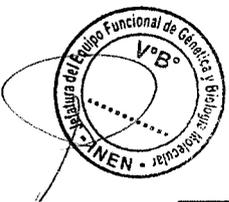
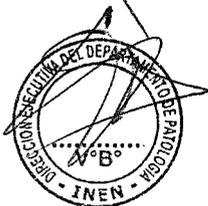
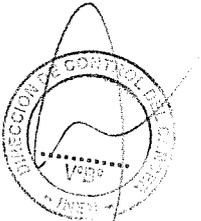
VIII. SUMINISTROS. –**8.1 Insumos y material médico:**

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrupo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla M
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L



**PNT.DNCC. INEN.004. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN AML1/ETO V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Gorro descartable de enfermera
- Reactivo para extracción de arn x 100 ml
- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 ml
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arn para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Primers específicos según gene de fusión a estudiar
- Enzima taq hot start dna polimerasa (5u/ul) x 1000 u
- Deoxinucleotidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno 200 µl para pcr con tapa plana x 1000
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 ul
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 l
- Colorante para ácidos nucleicos (adn) en gel de agarosa 10 000x x 200 ul
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer de carga 6x x 1 ml
- Tips 0.5 ul -10 ul x 500



**PNT.DNCC. INEN.004. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN AML1/ETO V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA. –****❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (2) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de

**PNT.DNCC. INEN.004. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN AML1/ETO V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

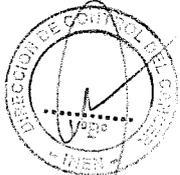
Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

**11.3 Procesamiento de la muestra:**

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o médula ósea

11.4 Separación de linfocitos:

Aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/ML. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad.

**11.5 Extracción y cuantificación de ARN:**

Se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

**11.6 Transformación de ARN en molécula de cADN:**

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.7 Amplificación:

Se prepara el proceso de PCR convencional, identificando el gen de fusión a estudiar por medio del uso de primers específicos para el gen de fusión AML/ETO, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

11.8 Preparación de gel:

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos ayudara a analizar el amplicón (producto obtenido del proceso de la amplificación) por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

11.9 Análisis de resultado:

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia del gen de fusión (bandas de peso molecular específicos para el gen de fusión AML/ETO) según bibliografía (2) y protocolos internos.





PNT.DNCC. INEN.004. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN AML1/ETO V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

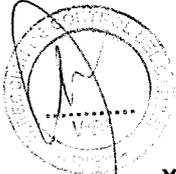
11.10 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.



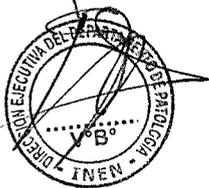
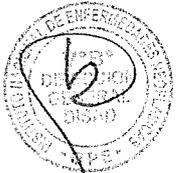
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 19 de mayo de 2016; 127(20):2391-405.
2. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. diciembre de 1999; 13(12):1901.



XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras



[Handwritten signature]



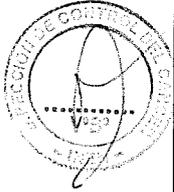


PNT.DNCC. INEN.004. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN AML1/ETO V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: 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	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN. 005. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección del gen de fusión CFBF/MYH11 por PCR en tiempo final.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –**

- Código CPMS (MINSa): 88299.13
- Código Tarifario INEN: 210728

III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección del gen de fusión CFBf/MYH11, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

IV. RESPONSABILIDADES. –

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.



**PNT.DNCC. INEN. 005. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminotetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

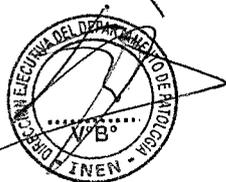
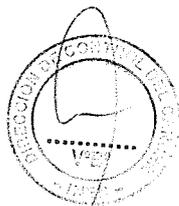
Prueba utilizada para estudio de gen de fusión utilizado para diagnóstico y gradación de riesgo (pronóstico) de leucemias agudas de estirpe mieloide no promielocítica en pacientes pediátricos y adultos, según guías actuales internacionales. (1).

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos (02)
- Vortex

**PNT.DNCC. INEN. 005. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Microcentrifuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20In
- Unidad de central de proceso –cpu de 3.1ghz
- Teclado- keyboard con puerto usb
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser

**7.2 Instrumentales. –**

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

7.3 Mobiliario. –

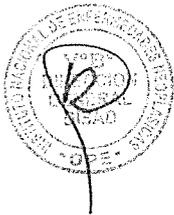
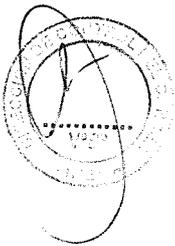
- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos

**PNT.DNCC. INEN. 005. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

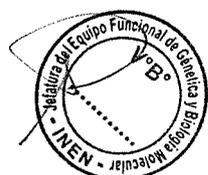
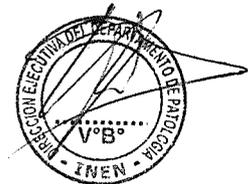
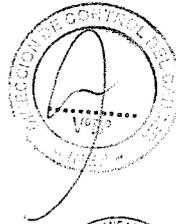
**VIII. SUMINISTROS. –****8.1 Insumos y material médico:**

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con tricotan x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla M
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Gorro descartable de enfermera
- Reactivo para extracción de arn x 100 ml



**PNT.DNCC. INEN. 005. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 ml (2)
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arm para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Primers específicos según gene de fusión a estudiar
- Enzima taq hot start dna polimerasa (5u/ul) x 1000 u
- Deoxinucleotidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno 200 µl para pcr con tapa plana x 1000
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 ul
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (adn) en gel de agarosa 10 000x x 200 ul
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer de carga 6x x 1 ml
- Tips 0.5 ul -10 ul x 500E



**PNT.DNCC. INEN. 005. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA. –****❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (2) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

**PNT.DNCC. INEN. 005. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CBFb/MYH11 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.2 Registro de la muestra:**

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

11.3 Procesamiento de la muestra:

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o medula ósea.

11.4 Separación de linfocitos:

Aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/ML. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad.

11.5 Extracción y cuantificación de ARN:

Se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

11.6 Transformación de ARN en molécula de cADN:

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.7 Amplificación:

Se prepara el proceso de PCR convencional, identificando el gen de fusión a estudiar por medio del uso de primers específicos para el gen de fusión CBFb/MYH11, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

11.8 Preparación de gel:

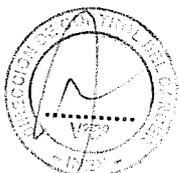
Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos ayudara a analizar el amplicón (producto obtenido del proceso de la amplificación) por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

11.9 Análisis de resultado:

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia del gen de fusión (bandas de peso molecular específicos para el gen de fusión CBFb/MYH11) según bibliografía (2) y protocolos internos.

11.10 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes





PNT.DNCC. INEN. 005. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V 0.1

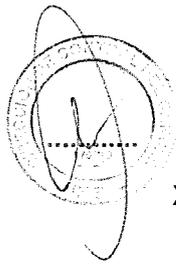
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.



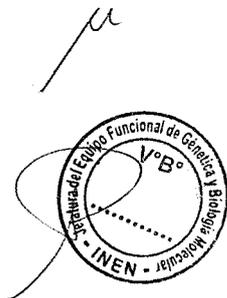
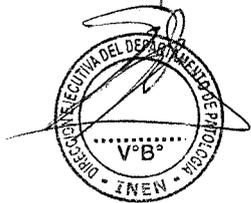
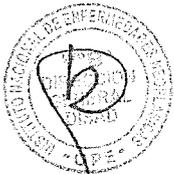
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 19 de mayo de 2016; 127(20):2391-405.
2. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. diciembre de 1999; 13(12):1901.



XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras



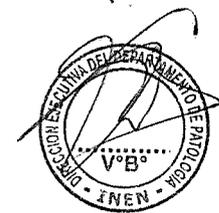
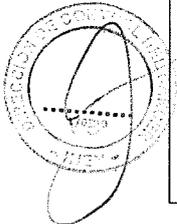


PNT.DNCC. INEN. 005. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: 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	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez

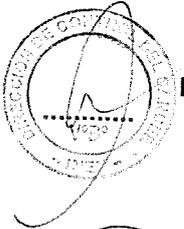


**PNT.DNCC. INEN. 006. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PML/RARa V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PML/RARa****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección del gen de fusión PML/RARa por PCR en tiempo final.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –**

- Código CPMS (MINSA): 81315.04
- Código Tarifario INEN: 210702

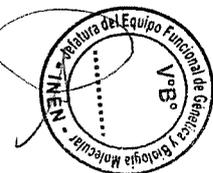
**III. ALCANCE. –**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección del gen de fusión PML/RARa, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

**IV. RESPONSABILIDADES. –**

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.



**PNT.DNCC. INEN. 006. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PML/RARa V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminotetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de transmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

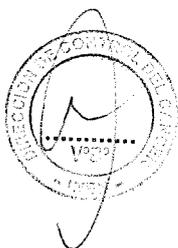
Prueba utilizada para estudio de gen de fusión PML/RARa utilizado para diagnóstico, definición de variante molecular (bcr1, bcr2 y bcr3) y gradación de riesgo en los casos de leucemia promielocítica en pacientes pediátricos y adultos según guías actuales internacionales. (1)

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos (02)

**PNT.DNCC. INEN. 006. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PML/RARα V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Vortex
- Microcentrifuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20In
- Unidad de central de proceso –cpu de 3.1ghz
- Teclado- keyboard con puerto usb
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- Cpu Intel core i7-477
- Impresora láser

**7.2 Instrumentales. –**

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

7.3 Mobiliario. –

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

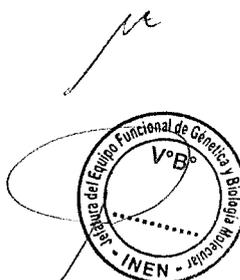
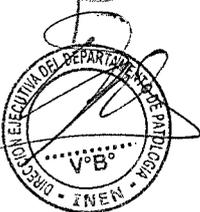
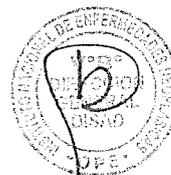
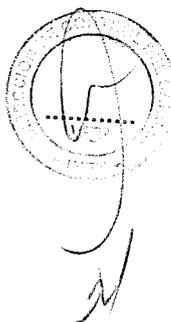


**PNT.DNCC. INEN. 006. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PML/RARa V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

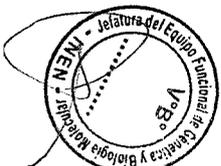
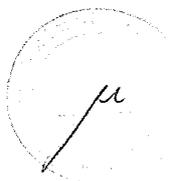
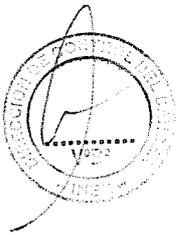
**VIII. SUMINISTROS. –****8.1 Insumos y material médico:**

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrupo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con tricotan x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla m
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar



**PNT.DNCC. INEN. 006. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PML/RARa V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Gorro descartable de enfermera
- Reactivo para extracción de arn x 100 ml
- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 ml
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 l
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arn para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Primers específicos según gene de fusión a estudiar
- Enzima taq hot start dna polimerasa (5u/ul) x 1000 u
- Deoxinucleotidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno 200 µl para pcr con tapa plana x 1000
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 ul
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 l
- Colorante para ácidos nucleicos (adn) en gel de agarosa 10 000x x 200 ul
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer de carga 6x x 1 ml



**PNT.DNCC. INEN. 006. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PML/RARa V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tips 0.5 ul -10 ul x 500

IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –**Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

X. MUESTRA. –**❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (2) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos

**PNT.DNCC. INEN. 006. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PML/RARa V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

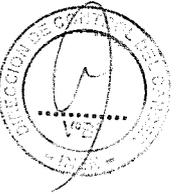
Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

**11.3 Procesamiento de la muestra:**

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o médula ósea.

**11.4 Separación de linfocitos:**

Aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/MI. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad.

**11.5 Extracción y cuantificación de ARN:**

Se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

11.6 Transformación de ARN en molécula de cADN:

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.7 Amplificación:

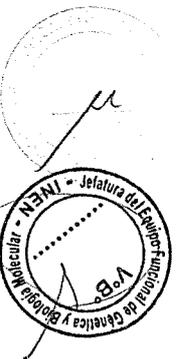
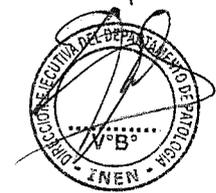
Se prepara el proceso de PCR convencional, identificando el gen de fusión a estudiar por medio del uso de primers específicos para el gen de fusión PML/RARa, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

11.8 Preparación de gel:

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos ayudará a analizar el amplicón (producto obtenido del proceso de la amplificación) por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

11.9 Análisis de resultado:

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia del gen de fusión (bandas





PNT.DNCC. INEN. 006. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PML/RARa V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

de peso molecular específicos para el gen de fusión PML/RARA según variantes bcr1, bcr2 y bcr3 según bibliografía (2) y protocolos internos.

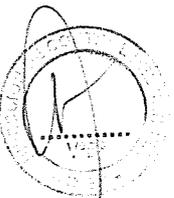
11.10 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.



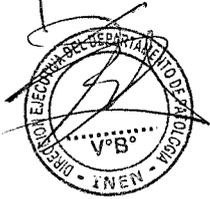
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 19 de mayo de 2016; 127(20):2391-405.
2. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. diciembre de 1999; 13(12):1901.

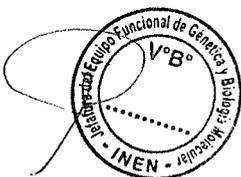


XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras



Handwritten signature

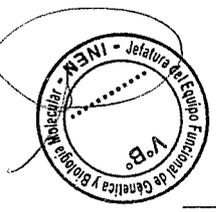
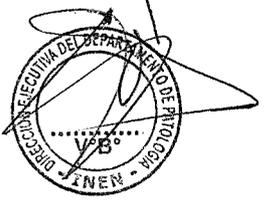
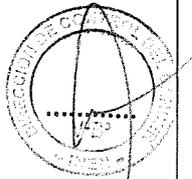




PNT.DNCC. INEN. 006. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PML/RARa V 0.1
 Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
 Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez





**PNT.DNCC. INEN.007. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PLZF/RARa V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PLZF/RARa****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección del gen de fusión PLZF/RARa por PCR en tiempo final.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –

- Código CPMS (MINSA): 88299.14
- Código Tarifario INEN: 210726

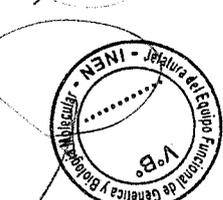
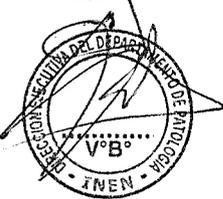
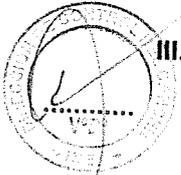
III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección del gen de fusión PLZF/RARa, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

IV. RESPONSABILIDADES. –

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.



**PNT.DNCC. INEN.007. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PLZF/RARa V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminotetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

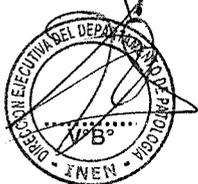
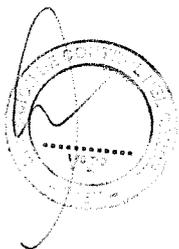
Prueba utilizada para estudio de gen de fusión utilizado para diagnóstico en casos de leucemia promielocítica en pacientes pediátricos y adultos sin evidencia de la presencia del gen de fusión PML/RARa.

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos (02)
- Vortex

**PNT.DNCC. INEN.007. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PLZF/RARa V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

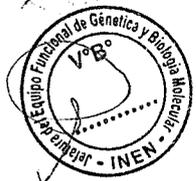
- Microcentrífuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20In
- Unidad de central de proceso –CPU de 3.1Ghz
- Teclado- Keyboard con puerto USB
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- CPU Intel core i7-477
- Impresora láser

**7.2 Instrumentales. –**

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

7.3 Mobiliario. –

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos

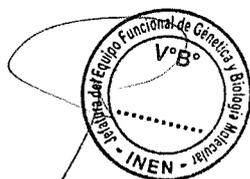
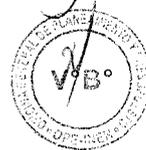
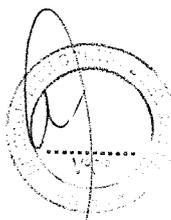


**PNT.DNCC. INEN.007. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PLZF/RARa V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

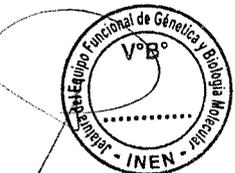
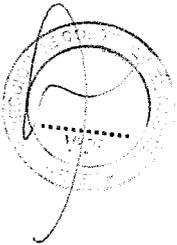
**VIII. SUMINISTROS. –****8.1 Insumos y material médico:**

- Mascarilla descartable tipo n-95
- Guante para examen descartable talla s
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con tricotan x 800 ml
- Guardapolvo de drill manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de drill para dama manga larga talla S
- Chaqueta de drill manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de drill manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón drill unisex talla M color celeste
- Pantalón drill unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla m
- Tacho de plástico 25 l aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 l



**PNT.DNCC. INEN.007. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PLZF/RARa V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Gorro descartable de enfermera
- Reactivo para extracción de ARN x 100 ml
- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 ml
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 l
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 l
- Cloroformo grado biología molecular x 1 l
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 l
- Agua para PCR x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arn para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Primers específicos según gene de fusión a estudiar
- Enzima taq hot start dna polimerasa (5u/ul) x 1000 u
- Deoxinucleotidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 el x 96
- Tubo de polipropileno 200 µl para pcr con tapa plana x 1000
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 ul
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 l
- Colorante para ácidos nucleicos (adn) en gel de agarosa 10 000x x 200 ul
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer de carga 6x x 1 ml
- Tips 0.5 ul -10 ul x 500



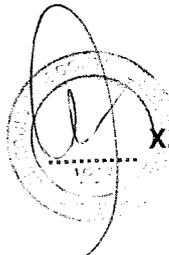
**PNT.DNCC. INEN.007. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PLZF/RARa V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA. –****❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

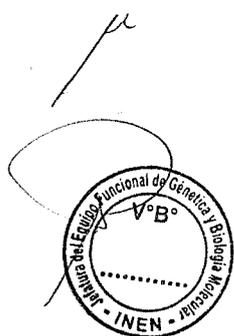
- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (1) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de



**PNT.DNCC. INEN.007. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PLZF/RARa V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

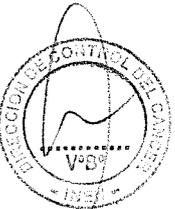
Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

**11.3 Procesamiento de la muestra:**

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o médula ósea.

**11.4 Separación de linfocitos:**

Aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/ML. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad.

**11.5 Extracción y cuantificación de ARN:**

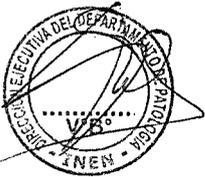
Se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

**11.6 Transformación de ARN en molécula de cADN:**

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.7 Amplificación:

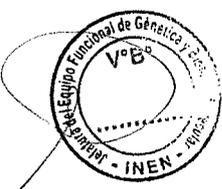
Se prepara el proceso de PCR convencional, identificando el gen de fusión a estudiar por medio del uso de primers específicos para el gen de fusión PLZF/RAR, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

**11.8 Preparación de gel:**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos ayudará a analizar el amplicón (producto obtenido del proceso de la amplificación) por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

11.9 Análisis de resultado:

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia del gen de fusión (bandas de peso molecular específicos para el gen de fusión PLZF/RAR) según bibliografía (1) y protocolos internos.





PNT.DNCC. INEN.007. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PLZF/RARa V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

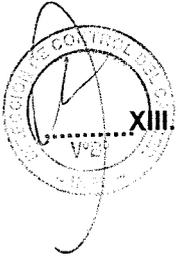
11.10 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.



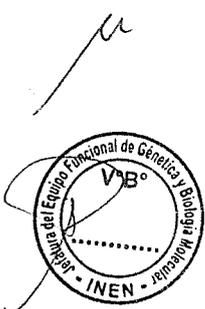
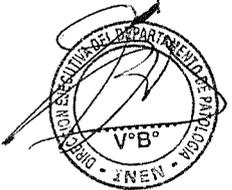
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. -

1. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. diciembre de 1999; 13(12):1901.



XIII. ANEXOS. -

1. Control de cambios y mejoras



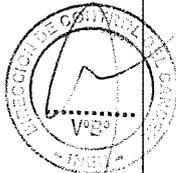


PNT.DNCC. INEN.007. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN PLZF/RARa V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS					
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	DE	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1-9	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	5/12/2019		M.C Pamela Mora Alferez

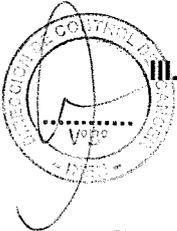


**PNT.DNCC. INEN.008. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN DEK/CAN V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN DEK/CAN****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección del gen de fusión DEK/CAN por PCR en tiempo final.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –**

- Código CPMS (MINSA): 88299.34
- Código Tarifario INEN: 210759

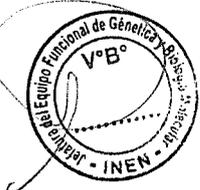
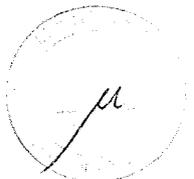
**III. ALCANCE. –**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección del gen de fusión DEK/CAN, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

**RESPONSABILIDADES. –**

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.



**PNT.DNCC. INEN.008. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN DEK/CAN V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminetetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

Prueba utilizada para Estudio de gen de fusión utilizado para el diagnóstico, gradación de riesgo (pronóstico) de leucemias agudas de estirpe mieloide no promielocítica en pacientes pediátricos y adultos, según guías actuales. (1)

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos (02)
- Vortex

**PNT.DNCC. INEN.008. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN DEK/CAN V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Microcentrífuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20In
- Unidad de central de proceso –cpu de 3.1ghz
- Teclado- keyboard con puerto usb
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser

7.2 Instrumentales. –

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

7.3 Mobiliario. –

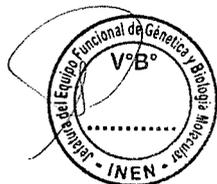
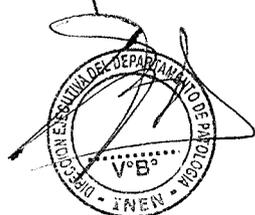
- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos

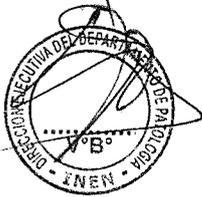
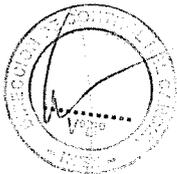
**PNT.DNCC. INEN.008. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN DEK/CAN V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

**VIII. SUMINISTROS. –****8.1 Insumos y material médico:**

- Mascarilla descartable tipo n-95
- Guante para examen descartable talla s
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 l aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con tricotan x 800 ml
- Guardapolvo de drill manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de drill para dama manga larga talla S
- Chaqueta de drill manga corta para caballero talla m color celeste
- Chaqueta de drill manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón drill unisex talla M color celeste
- Pantalón drill unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para Xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla m
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L



**PNT.DNCC. INEN.008. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN DEK/CAN V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Gorro descartable de enfermera
- Reactivo para extracción de arn x 100 ml
- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 ml
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Agua para PCR x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arn para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Primers específicos según gene de fusión a estudiar
- Enzima taq hot start dna polimerasa (5u/ul) x 1000 u
- Deoxinucleotidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno 200 µl para pcr con tapa plana x 1000
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 ul
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (adn) en gel de agarosa 10 000x x 200 ul
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer de carga 6x x 1 ml
- Tips 0.5 ul -10 ul x 500

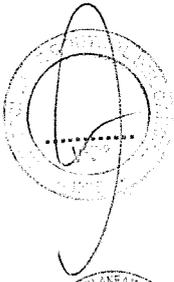
**PNT.DNCC. INEN.008. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN DEK/CAN V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA. –****❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (2) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de

**PNT.DNCC. INEN.008. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN DEK/CAN V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

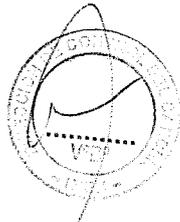
Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

**11.3 Procesamiento de la muestra:**

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o médula ósea.

**11.4 Separación de linfocitos:**

Aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/ML. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad.

**11.5 Extracción y cuantificación de ARN:**

Se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

**11.6 Transformación de ARN en molécula de cADN:**

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.7 Amplificación:

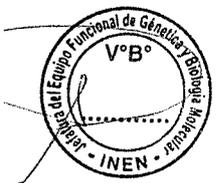
Se prepara el proceso de PCR convencional, identificando el gen de fusión a estudiar por medio del uso de primers específicos para el gen de fusión PLZF/RAR, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

**11.8 Preparación de gel:**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos ayudará a analizar el amplicón (producto obtenido del proceso de la amplificación) por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

11.9 Análisis de resultado:

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia del gen de fusión (bandas de peso molecular específicos para el gen de fusión DEK/CAN) según bibliografía (2) y protocolos internos.





PNT.DNCC. INEN.008. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN DEK/CAN V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

11.10 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.



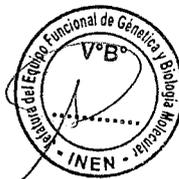
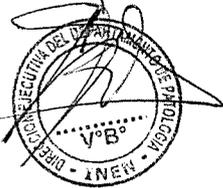
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 19 de mayo de 2016; 127(20):2391-405.
2. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. diciembre de 1999; 13(12):1901.



XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras





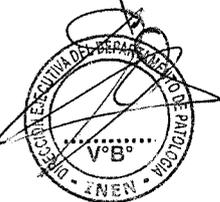
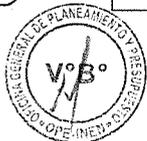
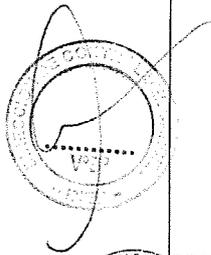
PNT.DNCC. INEN.008. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN DEK/CAN V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: 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	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN.009 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN FIP1L1/PDGFR A V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN FIP1L1/PDGFRa****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección del del gen de fusión FIP1L1/PDGFRa por PCR en tiempo final.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –

- Código CPMS (MINSA): 88299.1
- Código Tarifario INEN: 210730

III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección del gen de fusión FIP1L1/PDGFRa, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

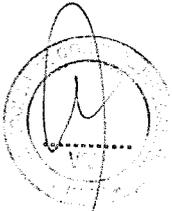
IV. RESPONSABILIDADES. –

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.

**PNT.DNCC. INEN.009 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN FIP1L1/PDGFR V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

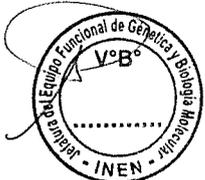
- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminetetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –**

Prueba utilizada para estudio de gen de fusión utilizado para diagnóstico leucemias agudas de estirpe mieloide con componente hipereosinofílico y síndromes hipereosinofílicos, en pacientes pediátricos y adultos.

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, elecromecánico, informático). –**

- Cámara de Flujo Laminar, clase II
- Centrifuga para tubos (02)
- Vortex



**PNT.DNCC. INEN.009 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN FIP1L1/PDGFRA V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Microcentrífuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20In
- Unidad de central de proceso –CPU de 3.1Ghz
- Teclado- Keyboard con puerto USB
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- CPU Intel core i7-477
- Impresora Láser

7.2 Instrumentales. –

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

7.3 Mobiliario. –

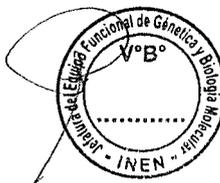
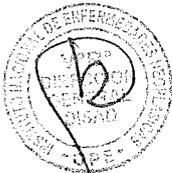
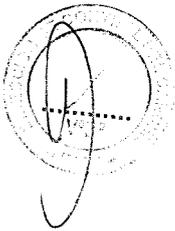
- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos

**PNT.DNCC. INEN.009 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN FIP1L1/PDGFR V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

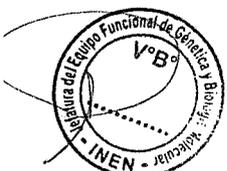
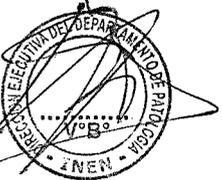
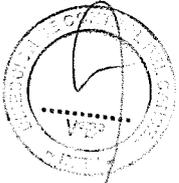
VIII. SUMINISTROS. –**8.1 Insumos y material médico:**

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrupo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con tricotan x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón drill unisex talla M color celeste
- Pantalón drill unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para Xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla m
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Gorro descartable de enfermera
- Reactivo para extracción de arn x 100 ml



**PNT.DNCC. INEN.009 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN FIP1L1/PDGFR V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 ml
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 l
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arm para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Primers específicos según gene de fusión a estudiar
- Enzima taq hot start dna polimerasa (5u/ul) x 1000 u
- Deoxinucleotidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno 200 µl para pcr con tapa plana x 1000
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 ul
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000x x 200 ul
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer de carga 6x x 1 ml
- Tips 0.5 ul -10 ul x 500



**PNT.DNCC. INEN.009 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN FIP1L1/PDGFRA V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA. –****❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (1) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

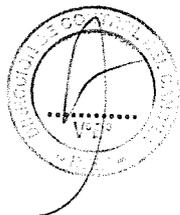
Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

**PNT.DNCC. INEN.009 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN FIP1L1/PDGFRA V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.2 Registro de la muestra:**

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

**11.3 Procesamiento de la muestra:**

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o médula ósea.

**11.4 Separación de linfocitos:**

Aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/ML. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad.

11.5 Extracción y cuantificación de ARN:

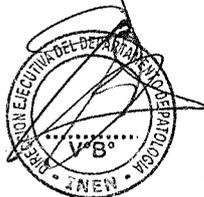
Se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

**11.6 Transformación de ARN en molécula de cADN:**

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.7 Amplificación:

Se prepara el proceso de PCR convencional, identificando el gen de fusión a estudiar por medio del uso de primers específicos para el gen de fusión FIP1L1/PDGFRA, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

**11.8 Preparación de gel:**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos ayudará a analizar el amplicón (producto obtenido del proceso de la amplificación) por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

11.9 Análisis de resultado:

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia del gen de fusión (bandas de peso molecular específicos para el gen de fusión FIP1L1/PDGFRA) según bibliografía (1) y protocolos internos.

11.10 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes



PNT.DNCC. INEN.009 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN FIP1L1/PDGFR V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

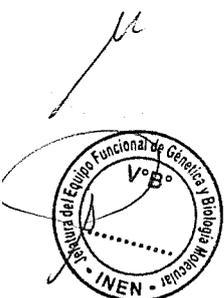
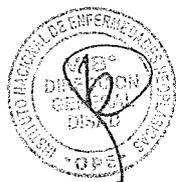
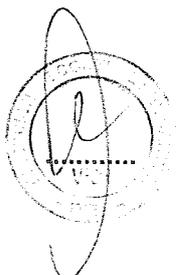
auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. diciembre de 1999; 13(12):1901.

XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras



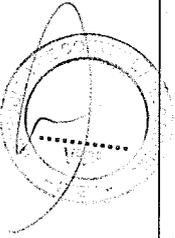


PNT.DNCC. INEN.009 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN FIP1L1/PDGFR V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN 010. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN SIL/TAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN SIL/TAL****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento Detección del gen de fusión SIL/TAL por PCR en tiempo final.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –

- Código CPMS (MINSA): 88299.26
- Código Tarifario INEN: 210760

III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección del gen de fusión SIL/TAL, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

IV. RESPONSABILIDADES. –

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.

V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.

**PNT.DNCC. INEN 010. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN SIL/TAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminetetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

Prueba utilizada para estudio de gen de fusión utilizado para diagnóstico y gradación de riesgo (pronóstico) de leucemias agudas de estirpe linfoide T en pacientes pediátricos y adultos.

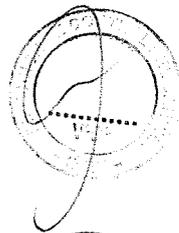
VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, elecromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase ii
- Centrifuga para tubos (02)
- Vortex
- Microcentrifuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador

**PNT.DNCC. INEN 010. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN SIL/TAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

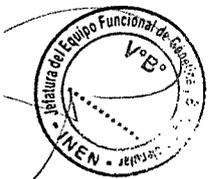
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20In
- Unidad de central de proceso –cpu de 3.1ghz
- Teclado- keyboard con puerto usb
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- Cpu Intel core i7-477
- Impresora láser

**7.2 Instrumentales. –**

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

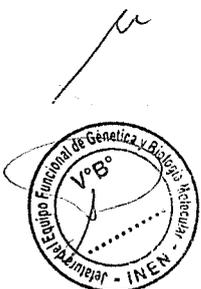
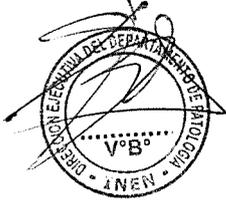
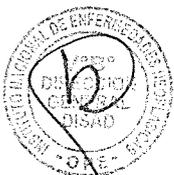
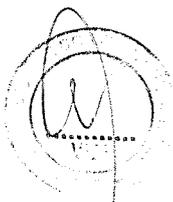
7.3 Mobiliario. –

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melamina
- Módulo de melamina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine



**PNT.DNCC. INEN 010. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN SIL/TAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**VIII. SUMINISTROS. –****8.1 Insumos y material médico:**

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de drill manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de drill para dama manga larga talla S
- Chaqueta de drill manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de drill manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón drill unisex talla M color celeste
- Pantalón drill unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para Xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla m
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Gorro descartable de enfermera
- Reactivo para extracción de arn x 100 ml
- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 ml
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml



**PNT.DNCC. INEN 010. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN SIL/TAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arm para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Primers específicos según gene de fusión a estudiar
- Enzima taq hot start dna polimerasa (5u/ul) x 1000 u
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa plana x 1000
- Deoxinucleotidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 ul
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000x x 200 ul
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer de carga 6x x 1 ml
- Tips 0.5 ul -10 ul x 500

**SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:



**PNT.DNCC. INEN 010. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN SIL/TAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA. –****❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

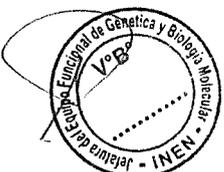
- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (1) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).



**PNT.DNCC. INEN 010. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN SIL/TAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.2 Registro de la muestra:**

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

11.3 Procesamiento de la muestra:

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o medula ósea.

11.4 Separación de linfocitos:

Aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/MI. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad.

11.5 Extracción y cuantificación de ARN:

Se usa la metodología trizol-cloformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

11.6 Transformación de ARN en molécula de cADN:

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.7 Amplificación:

Se prepara el proceso de PCR convencional, identificando el gen de fusión a estudiar por medio del uso de primers específicos para el gen de fusión SIL/TAL, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

11.8 Preparación de gel:

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos ayudará a analizar el amplicón (producto obtenido del proceso de la amplificación) por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

11.9 Análisis de resultado:

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia del gen de fusión (bandas de peso molecular específicos para el gen de fusión SIL/TAL) según bibliografía (1) y protocolos internos.



PNT.DNCC. INEN 010. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN SIL/TAL V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

11.10 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.



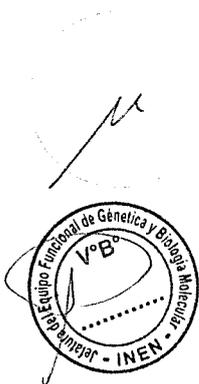
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. -

1. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. diciembre de 1999; 13(12):1901.



XIII. ANEXOS. -

1. Control de cambios y mejoras



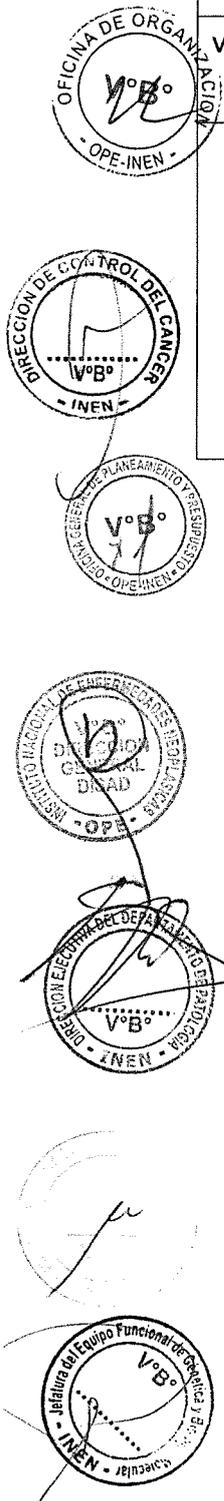


PNT.DNCC. INEN 010. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN DE FUSIÓN SIL/TAL V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: 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	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN 011. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p190 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p190 POR PCR EN TIEMPO FINAL****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento Detección del gen BCR/ABL1 p190 por PCR en tiempo final.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –

- Código CPMS (MINSA): 81207.03
- Código Tarifario INEN: 210719

III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección del gen BCR/ABL1 p190 por PCR en tiempo final, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

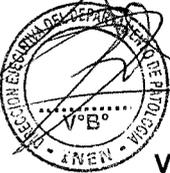
IV. RESPONSABILIDADES. –

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.

**PNT.DNCC. INEN 011. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p190 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminetetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –**

Prueba utilizada para estudio de gen de fusión utilizado para diagnóstico, gradación de riesgo (pronóstico) y posibilidad de uso de terapia blanco (inhibidores tirosino kinasa) en los casos de leucemias agudas de estirpe linfóide, de estirpe mielóide y en neoplasias mieloproliferativas crónicas en pacientes pediátricos y adultos, según guías actuales internacionales. (1)

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos (02)



**PNT.DNCC. INEN 011. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p190 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Vortex
- Microcentrifuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20In
- Unidad de central de proceso –CPU de 3.1ghz
- Teclado- keyboard con puerto usb
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser

7.2 Instrumentales. –

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

7.3 Mobiliario. –

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

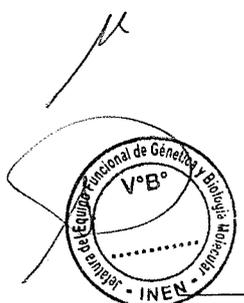
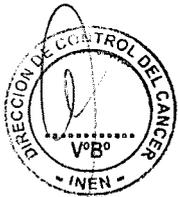
**PNT.DNCC. INEN 011. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p190 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

**VIII. SUMINISTROS. –****8.1 Insumos y material médico:**

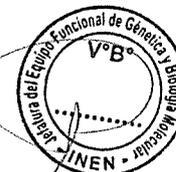
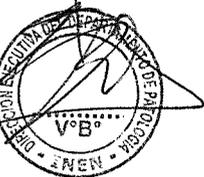
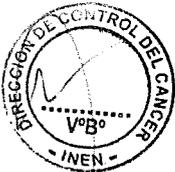
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla m color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla m color celeste
- Pantalón dril unisex talla s color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para Xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla M
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar



**PNT.DNCC. INEN 011. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p190 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Gorro descartable de enfermera
- Reactivo para extracción de arn x 100 ml
- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 ml
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arn para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrí fuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Primers específicos según gen de fusión a estudiar
- Enzima taq hot start dna polimerasa (5u/ul) x 1000 u
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentracion 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno 200 µl para pcr con tapa plana x 1000
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 ul
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000x x 200 ul
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer de carga 6x x 1 ml



**PNT.DNCC. INEN 011. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p190 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tips 0.5 ul -10 ul x 500

IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS**Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

**MUESTRA. –****❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (2) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología

**PNT.DNCC. INEN 011. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p190 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

11.3 Procesamiento de la muestra:

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o medula ósea.

11.4 Separación de linfocitos:

Aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/MI. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad.

11.5 Extracción y cuantificación de ARN:

Se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

11.6 Transformación de ARN en molécula de cADN:

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.7 Amplificación:

Se prepara el proceso de PCR convencional, identificando el gen de fusión a estudiar por medio del uso de primers específicos para el gen de fusión BCR/ABL1 p190, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

11.8 Preparación de gel:

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos ayudara a analizar el amplicón (producto obtenido del proceso de la amplificación) por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

11.9 Análisis de resultado:

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia del gen de fusión (bandas de peso molecular específicos para el gen de fusión BCR/ABL1 p190) según bibliografía (2) y protocolos internos.



PNT.DNCC. INEN 011. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p190 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

11.10 Elaboración y entrega de Resultado:

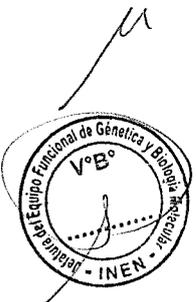
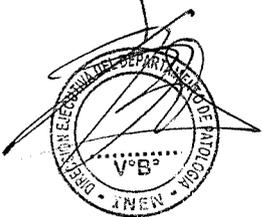
El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 19 de mayo de 2016; 127(20):2391-405.
2. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. diciembre de 1999; 13(12):1901.

XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras



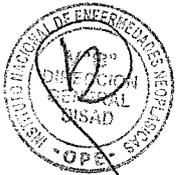
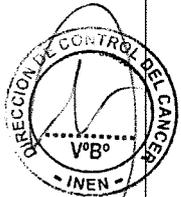


PNT.DNCC. INEN 011. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p190 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: 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	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez





**PNT.DNCC. INEN 012. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p210 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p210 POR PCR EN TIEMPO FINAL****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento Detección del gen BCR/ABL1 p210 por PCR en tiempo final.

**IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –**

- Código CPMS (MINSA): 81206.04
- Código Tarifario INEN: 210720

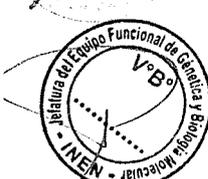
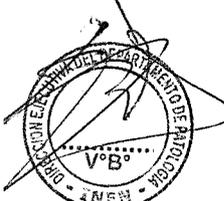
**II. ALCANCE. –**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección del gen BCR/ABL1 p210 por PCR en tiempo final, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

IV. RESPONSABILIDADES. –

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.



**PNT.DNCC. INEN 012. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p210 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminetetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

Prueba utilizada para estudio de gen de fusión utilizado para diagnóstico, gradación de riesgo (pronóstico) y posibilidad de uso de terapia blanco (inhibidores tirosino kinasa) en los casos de leucemias agudas de estirpe linfoide, de estirpe mieloide y en neoplasias mieloproliferativas crónicas en pacientes pediátricos y adultos, según guías actuales internacionales (1).

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase II

**PNT.DNCC. INEN 012. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p210 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Centrífuga para tubos (02)
- Vortex
- Microcentrífuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20In
- Unidad de central de proceso –cpu de 3.1ghz
- Teclado- keyboard con puerto usb
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser

7.2 Instrumentales. –

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

7.3 Mobiliario. –

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora

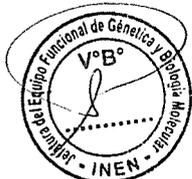
**PNT.DNCC. INEN 012. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p210 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

**VIII. SUMINISTROS. –****8.1 Insumos y material médico:**

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para Xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla M
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo



**PNT.DNCC. INEN 012. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p210 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Mandilón descartable talla estándar
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Gorro descartable de enfermera
- Reactivo para extracción de ARN x 100 ml
- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 ml
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arn para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Primers específicos según gene de fusión a estudiar
- Enzima taq hot start dna polimerasa (5u/ul) x 1000 u
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno 200 µl para pcr con tapa plana x 1000
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 ul
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 l
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000x x 200 ul
- Agarosa grado biología molecular x 500 g

**PNT.DNCC. INEN 012. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p210 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Buffer de carga 6x x 1 ml
- Tips 0.5 ul -10 ul x 500

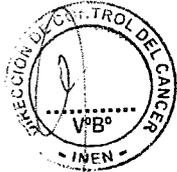
**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA. –****❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (2) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos

**PNT.DNCC. INEN 012. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p210 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

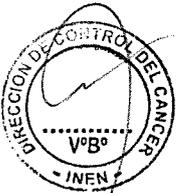
Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

**11.3 Procesamiento de la muestra:**

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o medula ósea.

**11.4 Separación de linfocitos:**

Aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/MI. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad.

**11.5 Extracción y cuantificación de ARN:**

Se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

11.6 Transformación de ARN en molécula de cADN:

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.7 Amplificación:

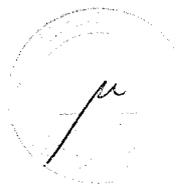
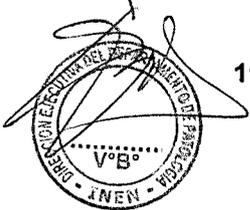
Se prepara el proceso de PCR convencional, identificando el gen de fusión a estudiar por medio del uso de primers específicos para el gen de fusión BCR/ABL1 p210, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

11.8 Preparación de gel:

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos ayudara a analizar el amplicón (producto obtenido del proceso de la amplificación) por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

11.9 Análisis de resultado:

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia del gen de fusión (bandas





PNT.DNCC. INEN 012. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p210 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

de peso molecular específicos para el gen de fusión BCR/ABL1 p210) según bibliografía (2) y protocolos internos.

11.10 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.



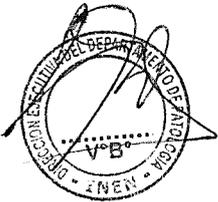
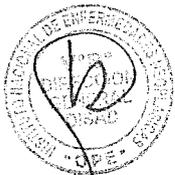
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 19 de mayo de 2016; 127(20):2391-405.
2. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. diciembre de 1999; 13(12):1901.

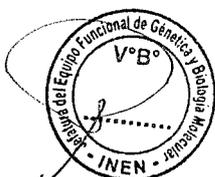


XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras



[Handwritten signature]



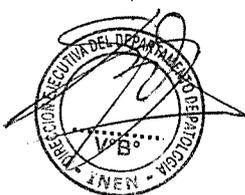
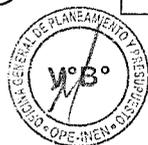
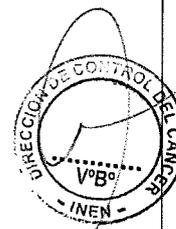


PNT.DNCC. INEN 012. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DEL GEN BCR/ABL1 p210 POR PCR EN TIEMPO FINAL V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS					
VERSION	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	DE	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1-9	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	5/12/2019		M.C Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN 013. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p210 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p210****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección y Cuantificación BCR/ABL1 p210 por PCR en tiempo real.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –

- Código CPMS (MINSA): 81206.07
- Código Tarifario INEN: 210731

III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección y Cuantificación BCR/ABL1 p210, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

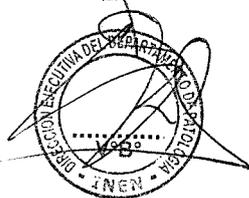
IV. RESPONSABILIDADES. –

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

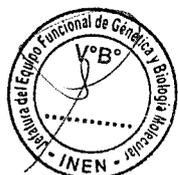
- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.

**PNT.DNCC. INEN 013. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p210 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminetetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –**

Estudio de cuantificación del gen de fusión utilizado para determinar el control de la enfermedad (Enfermedad mínima residual) y valorar la respuesta al tratamiento o la falla de respuesta al tratamiento a las terapias blanco (inhibidores tirosino kinasa) en los casos de las neoplasias mieloproliferativas crónicas con detección previa de la presencia del gen de fusión BCR/ABL1 variante p210 en pacientes pediátricos y adultos, según guías actuales internacionales (1), además en casos de leucemias agudas en los cuales se haya identificado dicho gen de fusión previamente.

**VII. EQUIPAMIENTO. –****7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

**PNT.DNCC. INEN 013. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p210 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos.
- Microcentrífuga refrigerada.
- Vortex (02).
- Refrigeradora
- Equipo para determinación de pcr en tiempo real.
- Cámara de flujo laminar-Purificador vertical de metal
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20 in
- Unidad central de proceso - cpu de 3.1 ghz
- Teclado - keyboard con puerto usb
- Equipo para aire acondicionado tipo doméstico de 24000 btu tipo piso techo
- Lectora de código de barras

7.2 Instrumentales. –

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

7.3 Mobiliario. –

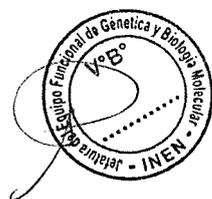
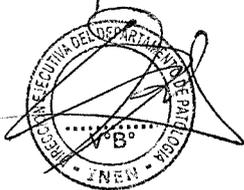
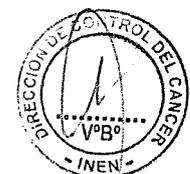
- Silla giratoria de metal tipo cajero

**PNT.DNCC. INEN 013. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p210 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

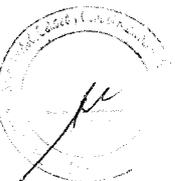
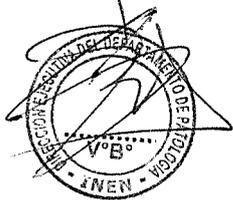
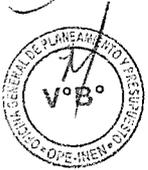
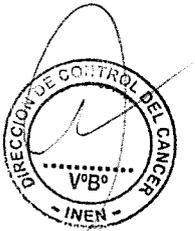
**VIII. SUMINISTROS. –****8.1 Insumos y material médico:**

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrupo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla s color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para Xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla M



**PNT.DNCC. INEN 013. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p210 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Gorro descartable unisex x 100
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 l
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arn para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Sistema para detección y cuantificación de la expresión génica de la t (9,22) x 100 determinaciones
- Sistema para detección y cuantificación del gen abl x 100 determinaciones
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Placa transparente de 96 pocillos para equipo para prueba pcr en tiempo real lightcycler 480 x 50
- Tips con filtro 1000 ul x 96



**PNT.DNCC. INEN 013. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p210 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

MUESTRA. –**❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (2) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de

**PNT.DNCC. INEN 013. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p210 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

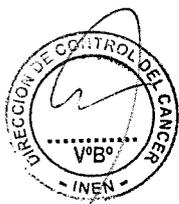
Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

**11.3 Procesamiento de la muestra:**

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o médula ósea.

**11.4 Extracción y cuantificación de ARN:**

Proceso que incluye la Separación de linfocitos que consiste en el aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/ML. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad que es la Extracción y cuantificación de ARN propiamente dicha, para esto se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular; en posterior será necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

**11.5 Transformación de ARN en molécula de cADN:**

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.6 Amplificación en tiempo real:

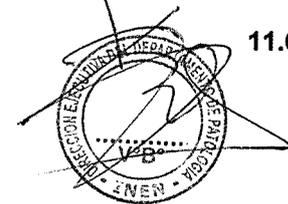
Se utiliza el Sistema para detección y cuantificación de la expresión génica de la t(9;22) variante p210 y el sistema para detección y cuantificación del gen ABL, este sistema incluye los plásmidos para cuantificar el gen de fusión y el gen control de la prueba; así como la master mix necesaria para el proceso (que incluye la enzima polimerasa para la amplificación), el producto final es llevado en una placa transparente de 96 pocillos al equipo termociclador en tiempo real donde se irán evidenciando las curvas de amplificación.

11.7 Análisis de resultado:

Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos del gen de fusión y del gen control; el resultado final se expresa por medio de una razón o cuantificación relativa entre las copias del gen de fusión BCR/ABL1 p210 y del gen control ABL1 por cien, expresado en porcentaje; según bibliografía (2) y protocolos internos.

11.8 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de





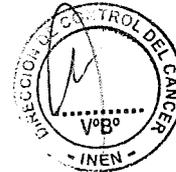
PNT.DNCC. INEN 013. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p210 V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

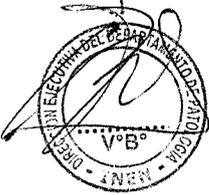
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Baccarani M1, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. Ann Hematol. 2015 Apr;94 Suppl 2: S141-7.
2. Gabert J1, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. Leukemia. 2003 Dec;17(12):2318-57.



XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras

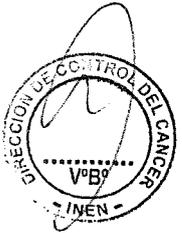




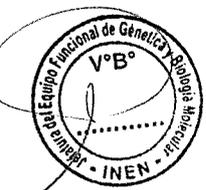
PNT.DNCC. INEN 013. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p210 V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: 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	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN 014. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p190 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p190****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección y Cuantificación BCR/ABL1 p190 por PCR en tiempo real.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –

- Código CPMS (MINSA): 81207.01
- Código Tarifario INEN: 210732

III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección y Cuantificación BCR/ABL1 p190, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

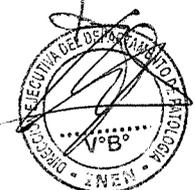
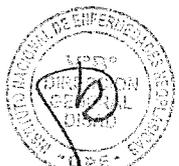
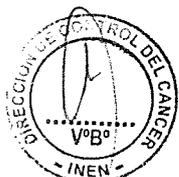
IV. RESPONSABILIDADES. –

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

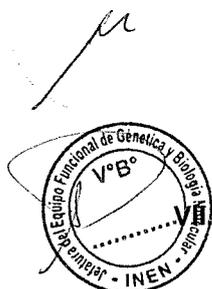
- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.

**PNT.DNCC. INEN 014. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p190 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminetetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

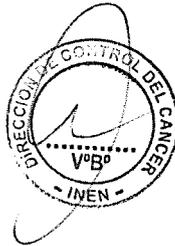
**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –**

Estudio de cuantificación del gen de fusión utilizado para determinar el control de la enfermedad (Enfermedad mínima residual) y valorar la respuesta al tratamiento o la falla de respuesta al tratamiento a las terapias blanco (inhibidores tirosino kinasa) en los casos de las neoplasias mieloproliferativas crónicas con detección previa de la presencia del gen de fusión BCR/ABL1 variante P190 en pacientes pediátricos y adultos, según guías actuales internacionales (1), además en casos de leucemias agudas en los cuales se haya identificado dicho gen de fusión previamente.

EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

**PNT.DNCC. INEN 014. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p190 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

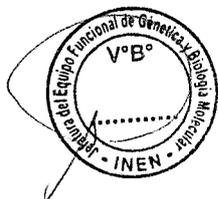
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos.
- Microcentrífuga refrigerada.
- Vortex (02).
- Refrigeradora
- Equipo para determinación de pcr en tiempo real.
- Cámara de flujo laminar-Purificador vertical de metal
- Teclado alfanumérico
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20 in
- Unidad central de proceso - cpu de 3.1 ghz
- Teclado - keyboard con puerto usb
- Equipo para aire acondicionado tipo domestico de 24000 btu tipo piso techo
- Lectora de código de barras

**7.2 Instrumentales. –**

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

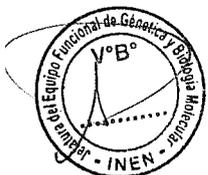
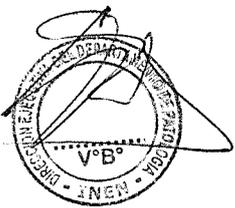
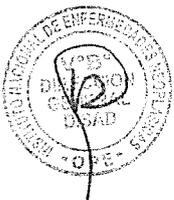
**7.3 Mobiliario. –**

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melamina
- Módulo de melamina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine



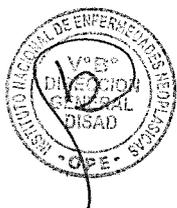
**PNT.DNCC. INEN 014. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p190 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**VIII. SUMINISTROS. –****8.1 Insumos y material médico:**

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrupo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para Xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla M
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Gorro descartable unisex x 100
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 ml x 500



**PNT.DNCC. INEN 014. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p190 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arm para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Sistema para detección y cuantificación de la expresión génica de la t (9,22) x 100 determinaciones
- Sistema para detección y cuantificación del gen abl x 100 determinaciones
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Placa transparente de 96 pocillos para equipo para prueba pcr en tiempo real lightcycler 480 x 50
- Tips con filtro 1000 ul x 96

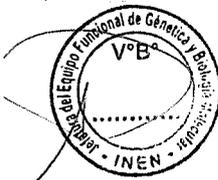
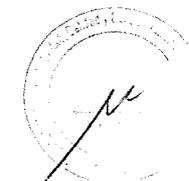
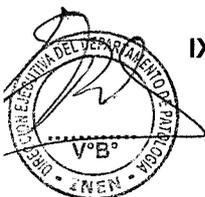
**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono



**PNT.DNCC. INEN 014. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p190 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**X. MUESTRA. –****❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

**❖ SISTEMA BIOLÓGICO:**

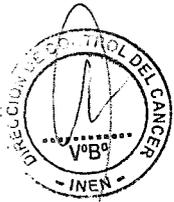
- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

**XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –**

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (2) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

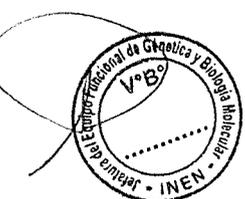
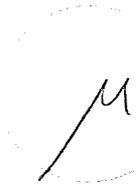
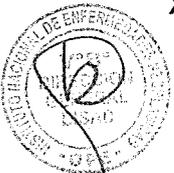
Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

11.3 Procesamiento de la muestra:

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o médula ósea.



**PNT.DNCC. INEN 014. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p190 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.4 Extracción y cuantificación de ARN:**

Proceso que incluye la Separación de linfocitos que consiste en el aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/MI. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad que es la Extracción y cuantificación de ARN propiamente dicha, para esto se usa la metodología trizol-cloformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular; en posterior será necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

11.5 Transformación de ARN en molécula de cADN:

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.6 Amplificación en tiempo real:

Se utiliza el Sistema para detección y cuantificación de la expresión génica de la t(9;22) variante p190 y el sistema para detección y cuantificación del gen ABL, este sistema incluye los plásmidos para cuantificar el gen de fusión y el gen control de la prueba; así como la master mix necesaria para el proceso (que incluye la enzima polimerasa para la amplificación), el producto final es llevado en una placa transparente de 96 pocillos al equipo termociclador en tiempo real donde se irán evidenciando las curvas de amplificación.

11.7 Análisis de resultado:

Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos del gen de fusión y del gen control; el resultado final se expresa por medio de una razón o cuantificación relativa entre las copias del gen de fusión BCR/ABL1 variante p190 y del gen control ABL1 por cien, expresado en porcentaje; según bibliografía (2) y protocolos internos.

11.8 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Baccarani M1, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. Ann Hematol. 2015 Apr;94 Suppl 2: S141-7
2. Gabert J1, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. Leukemia. 2003 Dec;17(12):2318-57

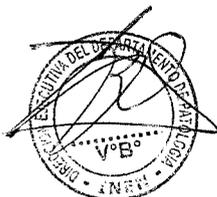
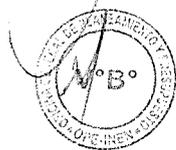


PNT.DNCC. INEN 014. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p190 V 0.1

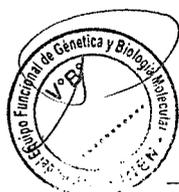
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras



M

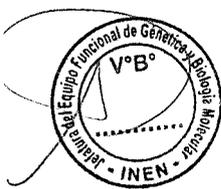
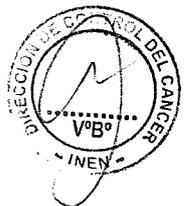


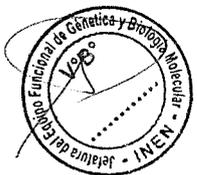
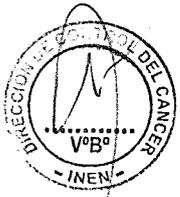


PNT.DNCC. INEN 014. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN BCR/ABL1 p190 V 0.1
 Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
 Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez





**PNT.DNCC. INEN 015. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr1 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr1****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección y Cuantificación PML/RARa bcr1 por PCR en tiempo real.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –**

- Código CPMS (MINSa): 81316.01
- Código Tarifario INEN: 210733

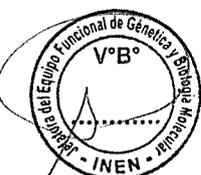
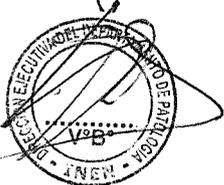
III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección y Cuantificación PML/RARa bcr1 por PCR en tiempo real, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

**IV. RESPONSABILIDADES. –**

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.



**PNT.DNCC. INEN 015. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr1 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminotetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

Estudio de cuantificación del gen de fusión utilizado para determinar el control de la enfermedad (Enfermedad mínima residual) en los casos de Leucemia Mieloide Promielocítica con detección previa de la presencia del gen de fusión PML/RARa variante bcr1 en pacientes pediátricos y adultos.

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos.

**PNT.DNCC. INEN 015. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr1 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

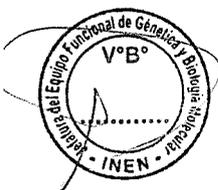
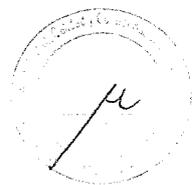
- Microcentrifuga refrigerada.
- Vortex (02).
- Refrigeradora
- Equipo para determinación de pcr en tiempo real.
- Cámara de flujo laminar
- Purificador vertical de metal
- Teclado alfanumérico
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20 in
- Unidad central de proceso - cpu de 3.1 ghz
- Teclado - keyboard con puerto usb
- Equipo para aire acondicionado tipo domestico de 24000 btu tipo piso techo
- Lectora de código de barras
- Computadora
- Impresora láser

**7.2 Instrumentales. –**

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

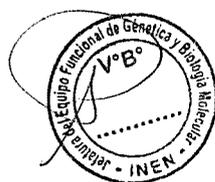
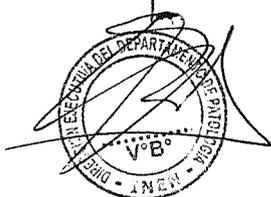
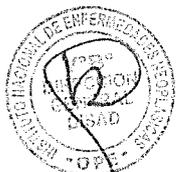
7.3 Mobiliario. –

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



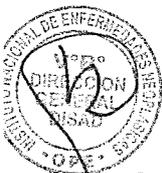
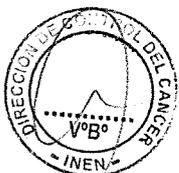
**PNT.DNCC. INEN 015. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr1 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**VIII. SUMINISTROS. –****8.1 Insumos y material médico:**

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrupo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 M
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón drill unisex talla M color celeste
- Pantalón drill unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño a4 (2)
- Tóner de impresión para xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla m
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Gorro descartable unisex x 100
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 ml x 500



**PNT.DNCC. INEN 015. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr1 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arm para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Sistema para detección y cuantificación de pml-rara/t (15;17) x100 determinaciones
- Sistema para detección y cuantificación del gen abl x 100 determinaciones
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Placa transparente de 96 pocillos para equipo para prueba pcr en tiempo real lightcycler 480 x 50
- Tips con filtro 1000 ul x 96

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono



**PNT.DNCC. INEN 015. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr1 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**X. MUESTRA. –****❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Gabert et al (1) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

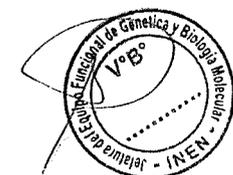
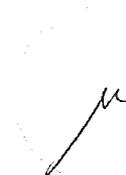
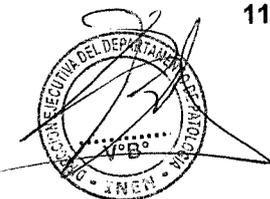
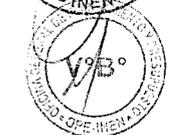
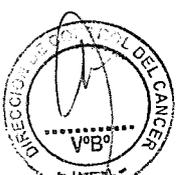
Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

11.3 Procesamiento de la muestra:

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o medula ósea.



**PNT.DNCC. INEN 015. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr1 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.4 Extracción y cuantificación de ARN:**

Proceso que incluye la Separación de linfocitos que consiste en el aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/MI. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad que es la Extracción y cuantificación de ARN propiamente dicha, para esto se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular; en posterior será necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

**11.5 Transformación de ARN en molécula de cADN:**

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

**11.6 Amplificación en tiempo real:**

Se utiliza el Sistema para detección y cuantificación de la expresión génica de la t(15;17) variante bcr1 y el sistema para detección y cuantificación del gen ABL, este sistema incluye los plásmidos para cuantificar el gen de fusión y el gen control de la prueba; así como la master mix necesaria para el proceso (que incluye la enzima polimerasa para la amplificación), el producto final es llevado en una placa transparente de 96 pocillos al equipo termociclador en tiempo real donde se irán evidenciando las curvas de amplificación.

**11.7 Análisis de resultado:**

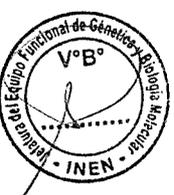
Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos del gen de fusión y del gen control; el resultado final se expresa por medio de una razón o cuantificación relativa entre las copias del gen de fusión PML/RARa variante bcr1 y del gen control ABL1 por cien, expresado en porcentaje; según bibliografía (1) y protocolos internos.

11.8 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Gabert J1, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2318-57



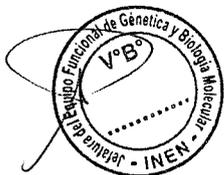
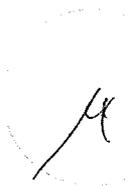
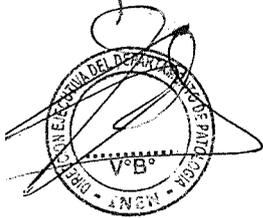
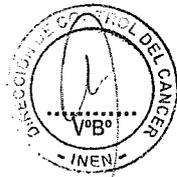


PNT.DNCC. INEN 015. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr1 V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

XIII. ANEXOS. –

- 1. Control de cambios y mejoras



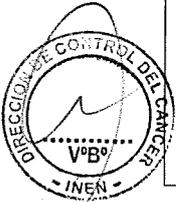


PNT.DNCC. INEN 015. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr1 V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: 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	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN 016. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr2 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr2****I. OBJETIVO. –**

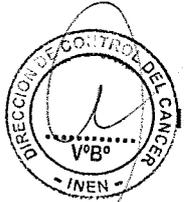
Normalizar el procedimiento de Detección y Cuantificación PML/RARa bcr2 por PCR en tiempo real.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –**

- Código CPMS (MINSAs): 81316.02
- Código Tarifario INEN: 210734

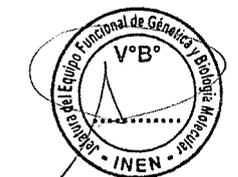
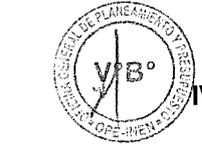
III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección y Cuantificación PML/RARa bcr2 por PCR en tiempo real, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

**IV. RESPONSABILIDADES. –**

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.



**PNT.DNCC. INEN 016. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr2 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminetetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de transmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

Estudio de cuantificación del gen de fusión utilizado para determinar el control de la enfermedad (Enfermedad mínima residual) en los casos de Leucemia Promielocítica con detección previa de la presencia del gen de fusión PML/RARa variante bcr2 en pacientes pediátricos y adultos.

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos.

**PNT.DNCC. INEN 016. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr2 V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Microcentrífuga refrigerada.
- Vortex (02)
- Refrigeradora
- Equipo para determinación de pcr en tiempo real.
- Cámara de flujo laminar - Purificador vertical de metal
- Teclado alfanumérico
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20 in
- Unidad central de proceso - cpu de 3.1 ghz
- Teclado - keyboard con puerto usb
- Equipo para aire acondicionado tipo domestico de 24000 tú tipo piso techo
- Lectora de código de barras
- Computadora
- Impresora láser

7.2 Instrumentales. –

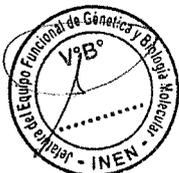
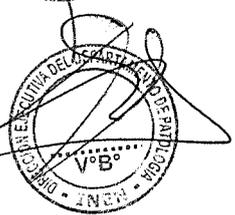
- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

7.3 Mobiliario. –

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

**PNT.DNCC. INEN 016. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr2 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**VIII. SUMINISTROS. –****8.1 Insumos y material médico:**

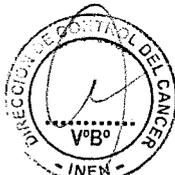
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrupo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla m
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Gorro descartable unisex x 100
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 ml x 500



**PNT.DNCC. INEN 016. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr2 V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para ARN para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Sistema para detección y cuantificación de pml-rara/t (15;17) x100 determinaciones
- Sistema para detección y cuantificación del gen abl x 100 determinaciones
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Placa transparente de 96 pocillos para equipo para prueba pcr en tiempo real lightcycler 480 x 50
- Tips con filtro 1000 ul x 96

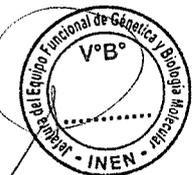
**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono



**PNT.DNCC. INEN 016. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr2 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**X. MUESTRA. –****❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

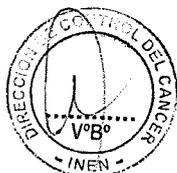
- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

**❖ SISTEMA BIOLÓGICO:**

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

**❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:**

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

**XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –**

Basado en metodología descrita por Gabert et al (1) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

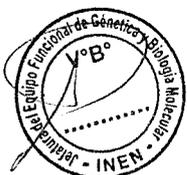
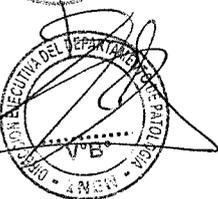
Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

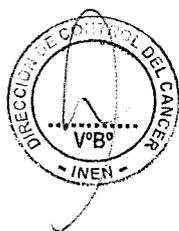
11.3 Procesamiento de la muestra:

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o medula ósea.



**PNT.DNCC. INEN 016. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr2 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.4 Extracción y cuantificación de ARN:**

Proceso que incluye la Separación de linfocitos que consiste en el aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/MI. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad que es la Extracción y cuantificación de ARN propiamente dicha, para esto se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular; en posterior será necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

**11.5 Transformación de ARN en molécula de cADN:**

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.6 Amplificación en tiempo real:

Se utiliza el Sistema para detección y cuantificación de la expresión génica de la t(15;17) variante bcr2 y el sistema para detección y cuantificación del gen ABL, este sistema incluye los plásmidos para cuantificar el gen de fusión y el gen control de la prueba; así como la master mix necesaria para el proceso (que incluye la enzima polimerasa para la amplificación), el producto final es llevado en una placa transparente de 96 pocillos al equipo termociclador en tiempo real donde se irán evidenciando las curvas de amplificación.

**11.7 Análisis de resultado:**

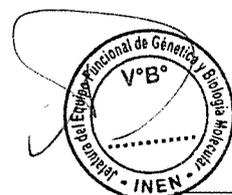
Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos del gen de fusión y del gen control; el resultado final se expresa por medio de una razón o cuantificación relativa entre las copias del gen de fusión PML/RARa variante bcr2 y del gen control ABL por cien, expresado en porcentaje; según bibliografía (1) y protocolos internos.

11.8 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Gabert J1, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. Leukemia. 2003 Dec;17(12):2318-57



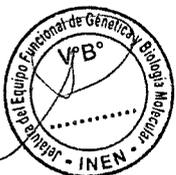
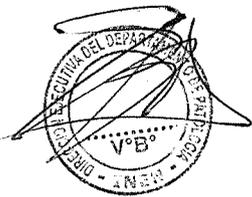


**PNT.DNCC. INEN 016. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr2 V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras



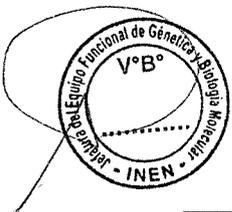
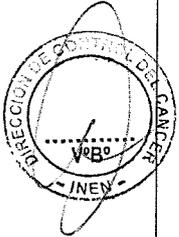


PNT.DNCC. INEN 016. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr2 V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN 017. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr3 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr3****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección y Cuantificación PML/RARa bcr3 por PCR en tiempo real.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –

- Código CPMS (MINSAs): 81316.03
- Código Tarifario INEN: 210735

III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección y Cuantificación PML/RARa bcr3 por PCR en tiempo real, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

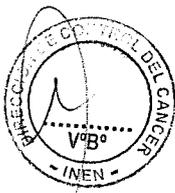
IV. RESPONSABILIDADES. –

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.

**PNT.DNCC. INEN 017. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr3 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

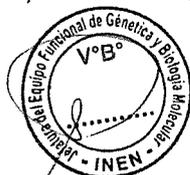
- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminetetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –**

Estudio de cuantificación del gen de fusión utilizado para determinar el control de la enfermedad (Enfermedad mínima residual) en los casos de Leucemia Mieloide Promielocítica con detección previa de la presencia del gen de fusión PML/RARa variante bcr3 en pacientes pediátricos y adultos.

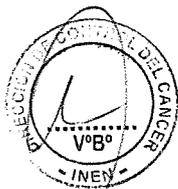
VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos.



**PNT.DNCC. INEN 017. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr3 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

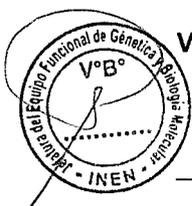
- Microcentrifuga refrigerada.
- Vortex (02).
- Refrigeradora
- Equipo para determinación de pcr en tiempo real.
- Cámara de flujo laminar- Purificador vertical de metal
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20 in
- Unidad central de proceso - cpu de 3.1 ghz
- Teclado - keyboard con puerto usb
- Equipo para aire acondicionado tipo domestico de 24000 btu tipo piso techo
- Lectora de código de barras
- Computadora
- Impresora láser

**7.2 Instrumentales. –**

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

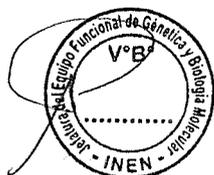
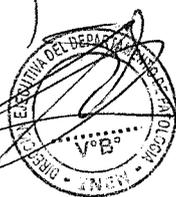
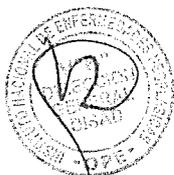
7.3 Mobiliario. –

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

VIII. SUMINISTROS. –**8.1 Insumos y material médico:**

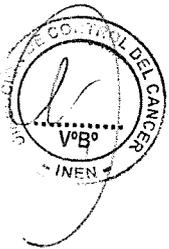
**PNT.DNCC. INEN 017. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr3 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 M
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla M
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Gorro descartable unisex x 100
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96



**PNT.DNCC. INEN 017. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr3 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para ARN para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Sistema para detección y cuantificación de pml-rara/t (15,17) x100 determinaciones
- Sistema para detección y cuantificación del gen abl x 100 determinaciones
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Placa transparente de 96 pocillos para equipo para prueba pcr en tiempo real lightcycler 480 x 50
- Tips con filtro 1000 ul x 96

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

X. MUESTRA. –**OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.

**PNT.DNCC. INEN 017. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr3 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ **SISTEMA BIOLÓGICO:**

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ **RECIPIENTE:**

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ **CONSERVACIÓN Y MANEJO:**

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

**XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –**

Basado en metodología descrita por Gabert et al (1) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

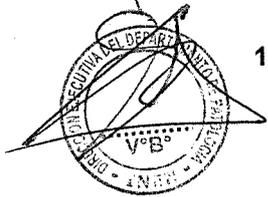
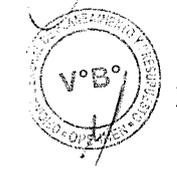
Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

11.3 Procesamiento de la muestra:

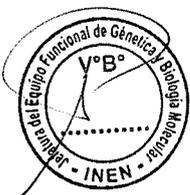
Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o médula ósea.

11.4 Extracción y cuantificación de ARN:

Proceso que incluye la Separación de linfocitos que consiste en el aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/MI. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad que es la Extracción y cuantificación de ARN propiamente dicha, para esto se usa la metodología trizol-cloformo, la



u



**PNT.DNCC. INEN 017. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr3 V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

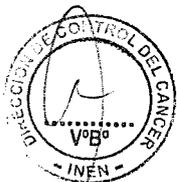
muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular; en posterior será necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

**11.5 Transformación de ARN en molécula de cADN:**

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.6 Amplificación en tiempo real:

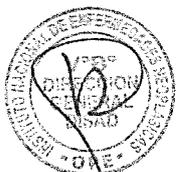
Se utiliza el Sistema para detección y cuantificación de la expresión génica de la t(15;17) variante bcr3 y el sistema para detección y cuantificación del gen ABL, este sistema incluye los plásmidos para cuantificar el gen de fusión y el gen control de la prueba; así como la master mix necesaria para el proceso (que incluye la enzima polimerasa para la amplificación), el producto final es llevado en una placa transparente de 96 pocillos al equipo termociclador en tiempo real donde se irán evidenciando las curvas de amplificación.

**11.7 Análisis de resultado:**

Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos del gen de fusión y del gen control; el resultado final se expresa por medio de una razón o cuantificación relativa entre las copias del gen de fusión PML/RARa variante bcr3 y del gen control ABL por cien, expresado en porcentaje; según bibliografía (1) y protocolos internos.

**11.8 Elaboración y entrega de Resultado:**

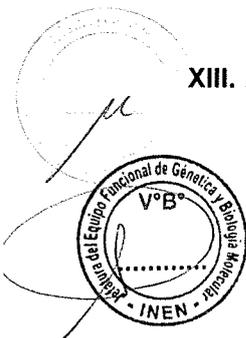
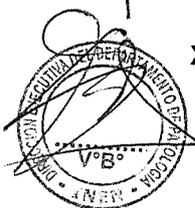
El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. -**

1. Gabert J1, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2318-57

XIII. ANEXOS. -

1. Control de cambios y mejoras



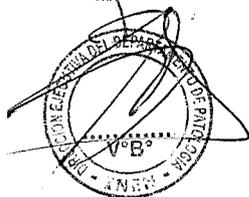
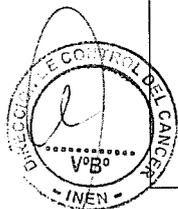


PNT.DNCC. INEN 017. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PML/RARa bcr3 V 0.1

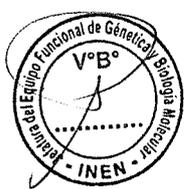
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: 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	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez



Handwritten signature





**PNT.DNCC. INEN 018. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN AML1/ETO TÉCNICA PCR EN TIEMPO
REAL V0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN AML1/ETO TÉCNICA PCR EN TIEMPO REAL

I. OBJETIVO. –

Normalizar el procedimiento de Detección y Cuantificación del gen AML1/ETO técnica PCR en tiempo real.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –

- Código CPMS (MINSA): 81206.01
- Código Tarifario INEN: 210715

III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección y Cuantificación del gen AML1/ETO técnica PCR en tiempo real, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

IV. RESPONSABILIDADES. –

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.



**PNT.DNCC. INEN 018. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN AML1/ETO TÉCNICA PCR EN TIEMPO
REAL V0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminotetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

Estudio de cuantificación del gen de fusión utilizado para determinar el control de la enfermedad (Enfermedad mínima residual) en los casos de Leucemia Mieloide Aguda con detección previa de la presencia del gen de fusión AML/ETO en pacientes pediátricos y adultos.

VII. EQUIPAMIENTO. –

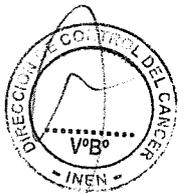
7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos.

**PNT.DNCC. INEN 018. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN AML1/ETO TÉCNICA PCR EN TIEMPO
REAL V0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

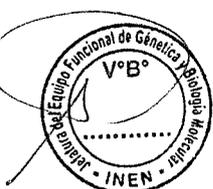
- Microcentrifuga refrigerada.
- Vortex (02).
- Refrigeradora
- Equipo para determinación de pcr en tiempo real.
- Cámara de flujo laminar-Purificador vertical de metal
- Teclado alfanumérico
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20 in
- Unidad central de proceso - cpu de 3.1 ghz
- Teclado - keyboard con puerto usb
- Equipo para aire acondicionado tipo domestico de 24000 btu tipo piso techo
- Lectora de código de barras
- Computadora
- Impresora láser

**7.2 Instrumentales. –**

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

**7.3 Mobiliario. –**

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melamina
- Módulo de melamina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

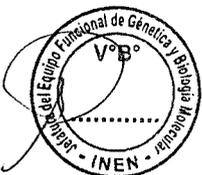
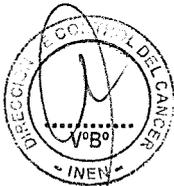


**PNT.DNCC. INEN 018. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN AML1/ETO TÉCNICA PCR EN TIEMPO
REAL V0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

VIII. SUMINISTROS. –**8.1 Insumos y material médico:**

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrupo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla M
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Gorro descartable unisex x 100
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 ml x 500

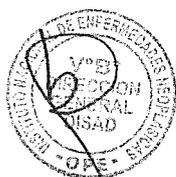
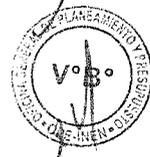
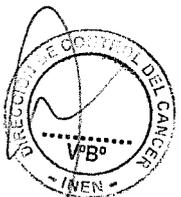




**PNT.DNCC. INEN 018. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN AML1/ETO TÉCNICA PCR EN TIEMPO
REAL V0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arn para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Plásmidos estándar gen fusión aml1/eto en diluc. Controlada 10,100,1000,100000,1000000 copias
- Plásmidos estándar gen abl en dilución controlada de 1000, 10000, 100000 copias
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Placa transparente de 96 pocillos para equipo para prueba pcr en tiempo real lightcycler 480 x 50
- Tips con filtro 1000 ul x 96



SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS

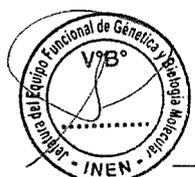
Servicios Técnicos:

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono





**PNT.DNCC. INEN 018. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN AML1/ETO TÉCNICA PCR EN TIEMPO
REAL V0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

X. MUESTRA. –

❖ **OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ **SISTEMA BIOLÓGICO:**

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ **RECIPIENTE:**

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ **CONSERVACIÓN Y MANEJO:**

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Gabert et al (1) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

11.3 Procesamiento de la muestra:

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o medula ósea.



**PNT.DNCC. INEN 018. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN AML1/ETO TÉCNICA PCR EN TIEMPO
REAL V0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

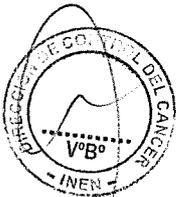
11.4 Extracción y cuantificación de ARN:

Proceso que incluye la Separación de linfocitos que consiste en el aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/MI. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad que es la Extracción y cuantificación de ARN propiamente dicha, para esto se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular; en posterior será necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.



11.5 Transformación de ARN en molécula de cADN:

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.



11.6 Amplificación en tiempo real:

Se utilizan los Plásmidos Estándar Gen Fusión Aml1/Eto En Diluc. Controlada 10, 100, 1000, 100000, 1000000 Copias y los Plásmidos Estándar Gen Abl En Dilución Controlada De 1000, 10000, 100000 Copias y el producto final es llevado en una placa transparente de 96 pocillos al equipo termociclador en tiempo real donde se irán evidenciando las curvas de amplificación.



11.7 Análisis de resultado:

Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos del gen de fusión y del gen control; el resultado final se expresa por medio de una razón o cuantificación relativa entre las copias del gen de fusión AML1/ETO y del gen control ABL por cien, expresado en porcentaje; según bibliografía (1) y protocolos internos.



11.8 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

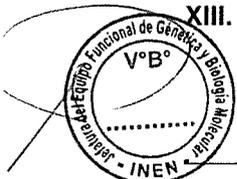


XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Gabert J1, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2318-57

XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras



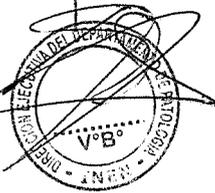
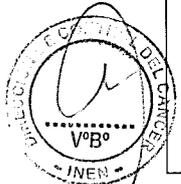


PNT.DNCC. INEN 018. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN AML1/ETO TÉCNICA PCR EN TIEMPO REAL V0.1

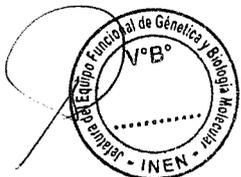
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1-8	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez



[Handwritten signature]

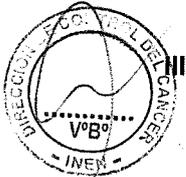


**PNT.DNCC. INEN 019. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Detección y Cuantificación del gen CFBF/MYH11 por PCR en tiempo real.

**IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –**

- Código CPMS (MINSA): 88299.2
- Código Tarifario INEN: 210767

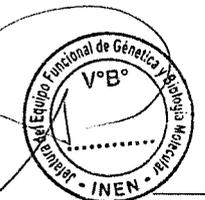
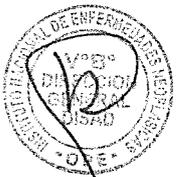
**III. ALCANCE. –**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección y Cuantificación del gen CFBF/MYH11/ETO, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

**IV. RESPONSABILIDADES. –**

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.



**PNT.DNCC. INEN 019. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –

- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminotetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

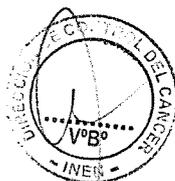
Estudio de cuantificación del gen de fusión utilizado para determinar el control de la enfermedad (Enfermedad mínima residual) en los casos de Leucemia Mieloide Aguda con detección previa de la presencia del gen de fusión CFBF/MYH en pacientes pediátricos y adultos.

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos.

**PNT.DNCC. INEN 019. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CBFβ/MYH11 V0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

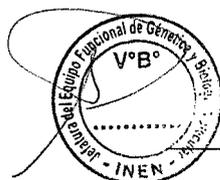
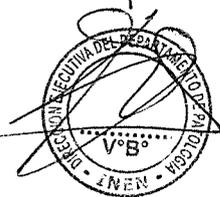
- Microcentrifuga refrigerada.
- Vortex (02).
- Refrigeradora
- Equipo para determinación de pcr en tiempo real.
- Cámara de flujo laminar - Purificador vertical de metal
- Teclado alfanumérico
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20 in
- Unidad central de proceso - cpu de 3.1 ghz
- Teclado - keyboard con puerto usb
- Equipo para aire acondicionado tipo domestico de 24000 btu tipo piso techo
- Lectora de código de barras
- Impresora láser

**7.2 Instrumentales. –**

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

**7.3 Mobiliario. –**

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

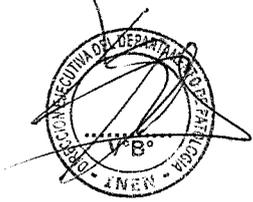
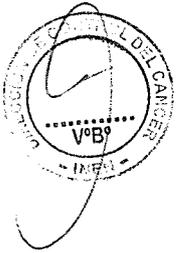


**PNT.DNCC. INEN 019. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

VIII. SUMINISTROS. –**8.1 Insumos y material médico:**

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrappo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla M
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Gorro descartable unisex x 100
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 ml x 500



[Handwritten mark]



**PNT.DNCC. INEN 019. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arm para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima Transcriptasa Reversa X 200 Determinaciones
- Tubo de Polipropileno Para PCR De 200 µl Con Tapa X 1000
- Tips Estéril Con Filtro 0.1 UI - 10 UI X 96
- Tips Estéril Con Filtro 20 UI - 200 UI X 96
- Primer Enr862 5'-Agggcccgttgactt-3' Nmol
- Primer Enr863 5'-Cctcgtaagcatccctgtga-3' Nmol
- Primer Enr865 5'-Ctcttctccagcgtctgcttat-3' Nmol
- Primer Enf803 5'-Cattagcacaacaggccttga-3' 50 Nmol
- Primer Enf1003 5'-Tggagataacacttaagcataactaaagg-3' 50 N
- Primer Enf1043 5'-Fam-Catttttggttggttcacaccatt-3' 50 N
- Primer Enf1063 5'-Gatgtagtgctgggacca -3' 50 N
- Solución premezclada para PCR tiempo real concentración 2x x 200 determinaciones
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 el x 96
- Tipos estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Placa transparente de 96 pocillos para equipo para prueba pcr en tiempo real lightcycler 480 x 50
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- PLÁSMIDOS ESTÁNDAR GEN ABL en dilución controlada de 1000, 10000, 100000 copias.
- PLASMIDOS ESTÁNDAR GEN FUSIÓN CFBF/MYH11 VARIANTE A EN DILUC. CONTROLADA 10,100,1000,100000,1000000 COPIAS.
- PLASMIDOS ESTÁNDAR GEN FUSIÓN CFBF/MYH11 VARIANTE D EN DILUC. CONTROLADA 10,100,1000,100000,1000000 COPIAS.



**PNT.DNCC. INEN 019. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V0.1**

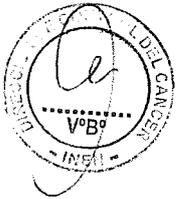
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- PLASMIDOS ESTÁNDAR GEN FUSIÓN CFBF/MYH11 VARIANTE E EN DILUC. CONTROLADA 10, 100, 1000, 100000, 1000000 COPIAS.
- Reactivo para extracción de ARN X 100ML.
- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos.

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

**Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA. –****❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

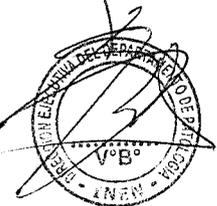
- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

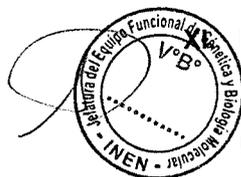
- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

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

Basado en metodología descrita por Gabert et al (1) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:



**PNT.DNCC. INEN 019. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.1 Toma de muestra:**

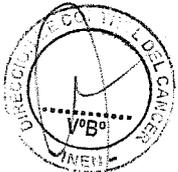
Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

**11.2 Registro de la muestra:**

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

11.3 Procesamiento de la muestra:

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o medula ósea.

**11.4 Extracción y cuantificación de ARN:**

Proceso que incluye la Separación de linfocitos que consiste en el aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/MI. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad que es la Extracción y cuantificación de ARN propiamente dicha, para esto se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular; en posterior será necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

**11.5 Transformación de ARN en molécula de cADN:**

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.6 Amplificación en tiempo real:

Se utilizan los primers y plásmidos estándar Gen Fusión CFBF/MYH11 en Diluc. Controlada 10, 100, 1000, 100000, 1000000 Copias y los Plásmidos Estándar Gen Abl en Dilución Controlada De 1000, 10000, 100000 Copias, así como la solución premezclada para prueba en PCR en tiempo real y el producto final es llevado en una placa transparente de 96 pocillos al equipo termociclador en tiempo real donde se irán evidenciando las curvas de amplificación.

11.7 Análisis de resultado:

Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos del gen de fusión y del gen control; el resultado final se expresa por medio de una razón o cuantificación relativa entre las copias del gen de fusión CFBF/MYH11 y del gen control ABL por cien, expresado en porcentaje; según bibliografía (1) y protocolos internos.





PNT.DNCC. INEN 019. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CFBF/MYH11 V0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

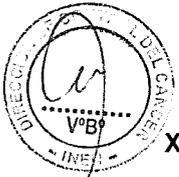
11.8 Elaboración y entrega de Resultado:

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.



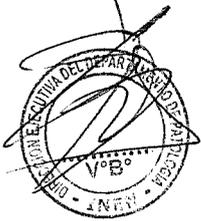
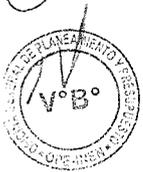
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Gabert J1, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. Leukemia. 2003 Dec;17(12):2318-57

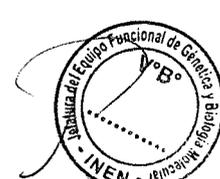


XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras



[Handwritten signature]



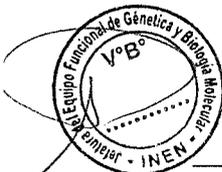
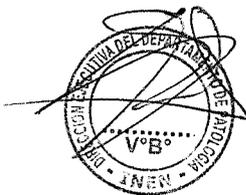
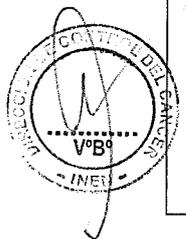


PNT.DNCC. INEN 019. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN DE FUSIÓN CBF/ MYH11 V0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN 020. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIAS LINFÁTICAS AGUDAS – CÉLULA B X PCR V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIAS LINFÁTICAS AGUDAS-CÉLULA B X PCR****I. OBJETIVO. –**

Normalizar el procedimiento de Panel molecular para Leucemias Linfáticas agudas-célula B x PCR en tiempo final.

II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –

- Código CPMS (MINSA): 88299.15
- Código Tarifario INEN: 210722

III. ALCANCE. –

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento Panel molecular para Leucemias Linfáticas agudas-célula B x PCR, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

IV. RESPONSABILIDADES. –

Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico en Laboratorio del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encarga de la toma de muestra de sangre periférica.
- Auxiliar asistencial del área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica: se encargan de la toma de muestra de sangre periférica.
- Personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de la recepción y regulación de los procesos administrativos relacionados al ingreso de las muestras.
- Médico Oncólogo de los Departamentos de Oncología Médica y Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.

**PNT.DNCC. INEN 020. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIAS LINFÁTICAS AGUDAS – CÉLULA B X PCR V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS. –**

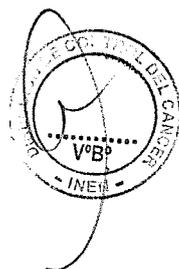
- Estudio Molecular. - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Punción de Médula ósea. - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Muestra de sangre periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Solución Anticoagulante. - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- Ácido Etilendiaminotetraacético – EDTA. - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico. - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico ADN. - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Ribonucleico – ARN. - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- ADN complementario - cDNA. - Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR. - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –

Prueba utilizada para diagnóstico y gradación de riesgo (pronóstico) de leucemias agudas de estirpe linfóide en pacientes pediátricos y adultos; según guías actuales internacionales. (1)

VII. EQUIPAMIENTO. –**7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos (02)
- Vortex

**PNT.DNCC. INEN 020. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIAS LINFÁTICAS AGUDAS – CÉLULA B X PCR V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

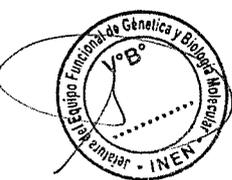
- Microcentrífuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20In
- Unidad de central de proceso –cpu de 3.1ghz
- Teclado- keyboard con puerto usb
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- Cpu intel core i7-477
- Impresora láser

7.2 Instrumentales. –

- Micropipeta volumen variable 0.5 ul -10 ul
- Micropipeta volumen variable 20 ul -200 ul
- Micropipeta volumen variable 100 ul – 1000 ul
- Micropipeta volumen variable 10 ul – 100 ul

7.3 Mobiliario. –

- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos



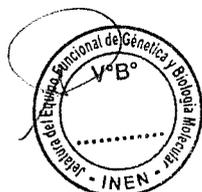
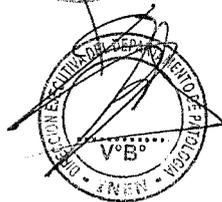
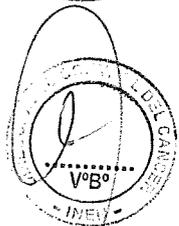
**PNT.DNCC. INEN 020. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIAS LINFÁTICAS AGUDAS – CÉLULA B X PCR V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

VIII. SUMINISTROS. –**8.1 Insumos y material médico:**

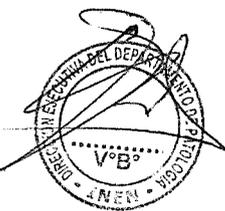
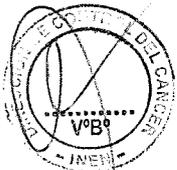
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrupo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla M
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Gorro descartable de enfermera
- Reactivo para extracción de arn x 100 ml



**PNT.DNCC. INEN 020. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIAS LINFÁTICAS AGUDAS – CÉLULA B X PCR V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 ml
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 ml
- Ficoll-hypaque densidad 1.077 g/ml x 100 ml
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 ml x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips con filtro 1000 ul x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. X 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Agua para pcr x 500 ml
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para arm para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 ml x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 µl con tapa x 1000
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Primers específicos de los genes de fusión a estudiar: e2a/pbx1, mll/af4, tel/aml1, bcr/abl p210, bcr/abl p190
- Enzima taq hot start dna polimerasa (5u/ul) x 1000 u
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 ul - 10 ul x 96
- Tubo de polipropileno 200 µl para pcr con tapa plana x 1000
- Tips estéril con filtro 20 ul - 200 ul x 96
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 ul
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (adn) en gel de agarosa 10 000x x 200 ul
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer de carga 6x x 1 ml
- Tips 0.5 ul -10 ul x 500



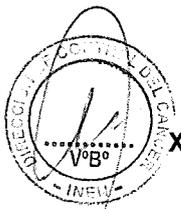
**PNT.DNCC. INEN 020. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIAS LINFÁTICAS AGUDAS – CÉLULA B X PCR V 0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS. –****Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

Servicios Públicos:

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA. –****❖ OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

- Sangre venosa: se realiza en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

❖ SISTEMA BIOLÓGICO:

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN)

❖ RECIPIENTE:

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

❖ CONSERVACIÓN Y MANEJO:

- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 4 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2-8°C. NO deben procesarse muestras con tiempos de conservación mayores a 24hrs.

XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO. –

Basado en metodología descrita por Van Dongen et al (2) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

11.1 Toma de muestra:

Realizada en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de



**PNT.DNCC. INEN 020. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIAS LINFÁTICAS AGUDAS – CÉLULA B X PCR V 0.1**

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea).

11.2 Registro de la muestra:

Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

11.3 Procesamiento de la muestra:

Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o médula ósea.

11.4 Separación de linfocitos:

Aislamiento de la fase leucocitaria agranulocítica por medio de la centrifugación por gradiente de densidad a baja velocidad usando el reactivo Ficoll-Hypaque densidad 1077G/ML. con obtención de Pellet que luego será resuspendido en Trizol (Reactivo para extracción de ARN) para la siguiente actividad.

11.5 Extracción y cuantificación de ARN:

Se usa la metodología trizol-cloroformo, la muestra resuspendida en trizol se mezcla con cloroformo y por metodología de centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ARN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ARN para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100ng/ul.

11.6 Transformación de ARN en molécula de cADN:

Se añaden los componentes del kit de Enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

11.7 Amplificación:

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para los genes de fusión E2A/PBX1, MLL/AF4, TEL/AML1, BCR/ABL p210, BCR/ABL p190, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene los productos amplificados de las regiones específicas.

11.8 Preparación de gel:

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos ayudara a analizar el amplicón (productos obtenidos del proceso de la amplificación) por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

11.9 Análisis de resultado:

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia de los genes de fusión (bandas de peso molecular específicos para los genes E2A/PBX1, MLL/AF4, TEL/AML1, BCR/ABL p210, BCR/ABL p190) según bibliografía (2) y protocolos internos.



PNT.DNCC. INEN 020. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIAS LINFÁTICAS AGUDAS – CÉLULA B X PCR V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

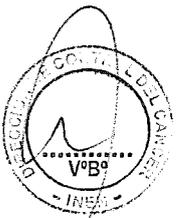
11.10 Elaboración y entrega de Resultados

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.



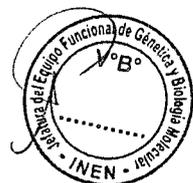
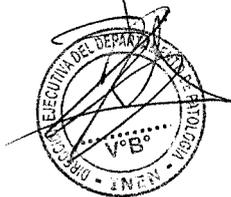
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 19 de mayo de 2016; 127(20):2391-405.
2. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. diciembre de 1999; 13(12):1901.



XIII. ANEXOS. –

1. Control de cambios y mejoras





PNT.DNCC. INEN 020. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIAS LINFÁTICAS AGUDAS – CÉLULA B X PCR V 0.1

Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1-9	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	5/12/2019	M.C Pamela Mora Alferez

