

REPUBLICA DEL PERU



RESOLUCION JEFATURAL

Surquillo, 10 de AGOSTO de 2020

VISTOS:

El Informe N° 161-2020-EFGBM-DP-DISAD/INEN de fecha 25 de julio de 2020, del Jefe del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, el Informe N° 157-2020-DNCC-DICON/INEN, de fecha 03 de agosto de 2020, emitido por el Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos, el Memorando N° 782-2020-OGPP/INEN, del 03 de agosto de 2020, de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto, el Informe N° 246-2020-DICON/INEN, de fecha 04 de agosto de 2020, de la Dirección de Control del Cáncer y el Informe N° 526-2020-OAJ/INEN del 07 de agosto del 2020, de la Oficina de Asesoría Jurídica, y;

CONSIDERANDO:

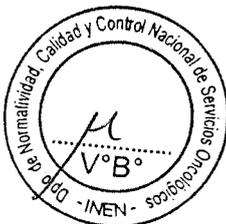
Que, a través de la Ley N° 28748, se creó como Organismo Público Descentralizado al Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas – INEN, con personería jurídica de derecho público interno, con autonomía económica, financiera, administrativa y normativa, adscrito al Sector Salud, constituyendo Pliego 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, con fecha 11 de enero del 2007, se aprobó el Reglamento de Organización y Funciones – ROF, del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas – INEN, estableciendo la jurisdicción, funciones generales y estructura orgánica del Instituto, así como las funciones de sus diferentes órganos y unidades orgánicas;

Que mediante 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, se estableció en su numeral 6.6, el procedimiento de revisión de los de Procedimientos Normalizados de Trabajo en el INEN;

Que, a través del Informe N° 161-2020-EFGBM-DP-DISAD/INEN de fecha 25 de julio de 2020, el Jefe del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular remitió para su revisión y validación al Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos, los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular – Tomo II;

Que, a través del Informe N° 157-2020-DNCC-DICON/INEN, de fecha 03 de agosto de 2020, emitido por el Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos, concluye que los 25 ANTEPROYECTOS DE PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO (PNT) DEL EQUIPO FUNCIONAL DE GENÉTICA Y



BIOLOGÍA MOLECULAR – TOMO II, cuenta con su visto bueno como unidad orgánica; asimismo, cuenta con la validación y visto bueno de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento, el Departamento de Patología y el Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular como órgano/unidad orgánica/equipo funcional proponente;

Que mediante Informe N° 109-2020-OO-OGPP/INEN, de fecha 03 de agosto del 2020, emitido por la Oficina de Organización, emite opinión técnica favorable, en relación a los 25 anteproyectos de Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) del Equipo Funcional De Genética Y Biología Molecular, indicando que no colisiona con la estructura orgánica o funcional de la Entidad;

Que, mediante Informe N° 719-2020-OPE-OGPP/INEN de fecha 03 de agosto de 2020, la Oficina de Planeamiento Estratégico, emite opinión favorable al total de los Procedimientos Normalizados de Trabajo, elaborado por el Equipo Funcional De Genética Y Biología Molecular, las mismas que se sujetan a la estructura de costos en cuanto a la identificación del CPMS, equipamiento y Suministro;

Que a través del Informe N° 246-2020-DICON/INEN, de fecha 04 de agosto de 2020, emitido por la Dirección de Control del Cáncer, procede a elevar a la Jefatura para su aprobación de 25 ANTEPROYECTOS DE PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO (PNT) DEL EQUIPO FUNCIONAL DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR – TOMO II;

Que, con Informe de vistos, la Oficina de Asesoría Jurídica opina que resulta viable la aprobación de los 25 Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular – Tomo II;

Contando con los vistos buenos de la Sub Jefatura Institucional, la Gerencia General, la Oficina de Organización, la Oficina de Planeamiento Estratégico, el Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos, del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, la Dirección Ejecutiva del Departamento de Patología, la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento y de la Oficina de Asesoría Jurídica del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas-INEN;

En uso de las atribuciones y facultades conferidas en el Decreto Supremo N° 001-2007-SA, que aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas - INEN y la Resolución Suprema N° 011-2018-SA;

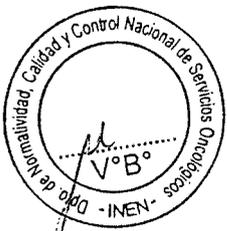
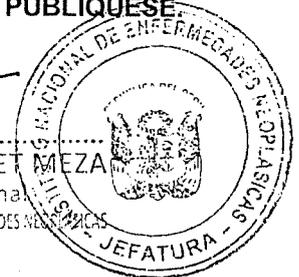
**SE RESUELVE:**

**ARTÍCULO PRIMERO. - APROBAR veinticinco (25) PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO (PNT) DEL EQUIPO FUNCIONAL DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR – TOMO II** que como anexo forman parte integrante de la presente Resolución.

**ARTÍCULO SEGUNDO. - ENCARGAR** a la Oficina de Comunicaciones de la Gerencia General del INEN, la publicación de la presente Resolución en el Portal Web Institucional.

**REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y PUBLÍQUESE**

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

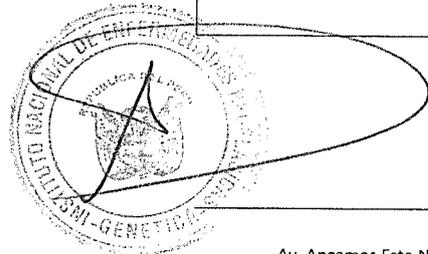
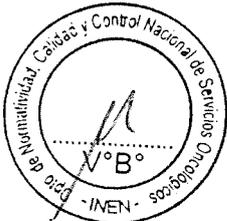




# PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO DEL EQUIPO FUNCIONAL DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

## TOMO II

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

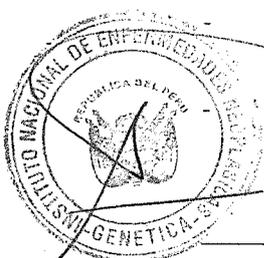
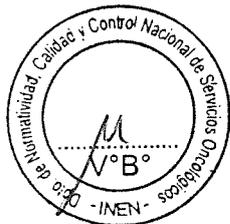


Elaborado por:	- M.C. Anali Pamela Mora Alferez	Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular
Revisado y validado por:	- M. C. Henry Guerra Miller	Departamento de Patología
	- M. C. Sheyla E. Vilchez Santillán	Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento.
	- Lic. Angel Winston Riquez Quispe - Mg. Christian Alberto Pino Melliz	Oficina de Organización
	- Mg. Piyo Félix Celestino Lázaro - Lic. Angelica Mogollon Monteverde	Oficina de Planeamiento Estratégico Unidad Funcional de Costos y Tarifas
Revisado y aprobado por	- M.C. Odorico Iván Belzusrri Padilla - M.C. Carmela Barrantes Serrano - Lic. Yoseline Aznarán Isla	Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos



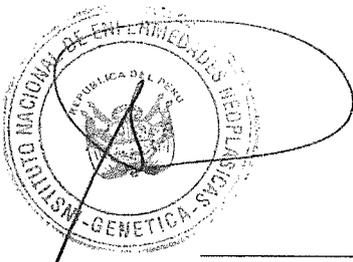
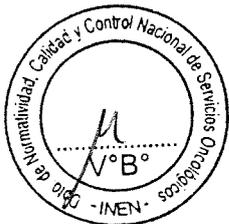
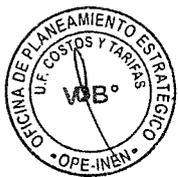
### CONTENIDO

- PNT.DNCC. INEN. 027. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p210 V.01
- PNT.DNCC. INEN. 028. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p190 V.01
- PNT.DNCC. INEN. 029. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN RET (EXONES 10, 11, 13, 14, 15 y 16) POR SECUENCIAMIENTO V.01
- PNT.DNCC. INEN. 030. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN VHL (EXONES 1, 2 Y 3) POR SECUENCIAMIENTO V.01
- PNT.DNCC. INEN. 031. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN PUNTUAL EN EL GEN BRCA1/2 POR SECUENCIAMIENTO V.01
- PNT.DNCC. INEN. 032. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN ITD DEL GEN FLT3 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V.01
- PNT.DNCC. INEN. 033. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN A DEL GEN NPM1 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V.01
- PNT.DNCC. INEN. 034. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS B, V.01
- PNT.DNCC. INEN. 035. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS T V.01
- PNT.DNCC. INEN. 036. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD 1p/19q PCR MÚLTIPLE V.01
- PNT.DNCC. INEN. 037. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PCR CUANTITATIVO CITOMEGALOVIRUS V. 01
- PNT.DNCC. INEN. 038. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE EPSTEIN BARR VIRUS V.01
- PNT.DNCC. INEN. 039. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE BK VIRUS V.01
- PNT.DNCC. INEN. 040. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE ADENOVIRUS V.01
- PNT.DNCC. INEN. 041. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE PARVOVIRUS B19, V. 01
- PNT.DNCC. INEN. 042. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS B V.01





- PNT.DNCC. INEN. 043. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS C V.01
- PNT.DNCC. INEN. 044. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HERPES VIRUS 6 V.01
- PNT.DNCC. INEN. 045. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA EWING V.01
- PNT.DNCC. INEN. 046. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA RABDOMIOSARCOMA V.01
- PNT.DNCC. INEN. 047. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA SINOVIAL V.01
- PNT.DNCC. INEN. 048. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACION DEL GEN BRAF V600E V.01
- PNT.DNCC. INEN. 049. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACION DEL GEN KRAS (CODONES 12, 13, 61) V.01
- PNT.DNCC.INEN. 050. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACIÓN DEL GEN EGFR (EXONES 18, 19, 20 Y 21) V. 01
- PNT.DNCC.INEN. 051. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCION DE MUTACIONES EN LOS EXONES 8 Y 17 DEL GEN C-KIT V.01





**PNT.DNCC. INEN. 027. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p210  
V.01**

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

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL  
DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p210**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de mutaciones del dominio TK del gen de fusión BCR/ABL p210.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.02
- Código Tarifario INEN: 210762

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección de mutaciones del dominio TK del gen de fusión BCR/ABL p210, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

**IV. RESPONSABILIDADES**

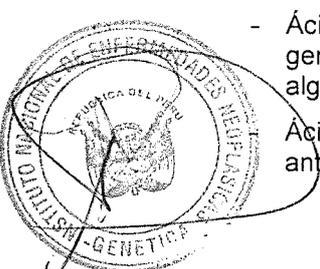
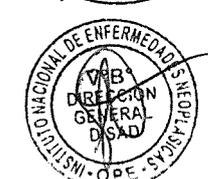
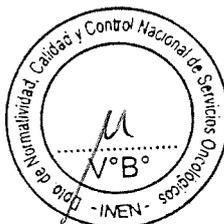
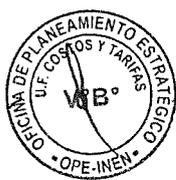
Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- 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 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, primer y segunda amplificación, preparación de geles, purificación de productos de PCR, reacción de secuenciamiento, purificación de secuenciamiento, secuenciamiento genético, 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.
- 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**

- 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 Etilendiaminetetraacético (EDTA): Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de



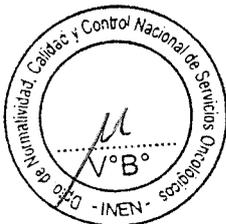


**PNT.DNCC. INEN. 027. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p210  
V.01**

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

plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.

- Ácido Nucleico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de transmisión de genes y síntesis de proteínas.
- Análisis de Fragmentos: Análisis del tamaño y cantidad de fragmentos de DNA amplificados por PCR y marcados con fluorescencia.
- Análisis de Secuenciamiento: Conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.
- 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.
- Muestra de Sangre Periférica: Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Mutaciones (TKD): Mutación o cambio en la secuencia del Dominio Tirosina Quinasa (TKD, siglas en inglés) que produce una variación en las características de este.
- PCR – NESTED: Variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de indicadores en cada una con el fin de incrementar la sensibilidad de detección.
- Punción de Médula Ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- 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.
- 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.



## VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Estudio de búsqueda de mutaciones asociadas a resistencia a las terapias blanco (inhibidores tirosino quinasa) en sospecha a falla a tratamiento, en los casos de las neoplasias mieloproliferativas crónicas y leucemias agudas con detección previa de la presencia del gen de fusión BCR/ABL1 variante p210 en pacientes pediátricos y adultos, según guías actuales internacionales (1).

## VII. EQUIPAMIENTO

### 7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –

- Analizador genético automatizado
- Balanza pequeña digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Cámara fotográfica digital





**PNT.DNCC. INEN. 027. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p210  
V.01**

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

- Centrífuga para tubos.
- Computadora
- Congeladora de metal, color plomo
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 btu tipo piso techo
- Espectrofotómetro
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Micrótopo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Termociclador
- Transiluminador
- Unidad central de proceso-CPU.
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.



### 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

### 7.3 Mobiliario

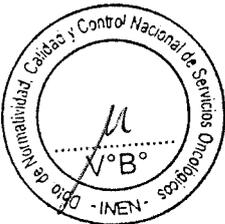
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Estante de melanina
- Mesa de metal
- Módulo de melanina para computadora
- Módulo para computadora enchapado en melamine
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Silla fija de metal con brazos
- Silla giratoria de metal tipo cajero

## VIII. SUMINISTROS

### 8.1 Insumos y Material:

#### 1° Actividad: Toma de muestra

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL

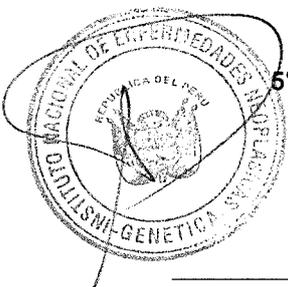
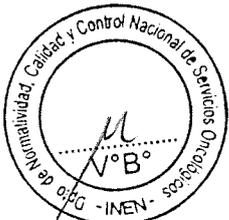




**PNT.DNCC. INEN. 027. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p210  
V.01**

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

- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrupo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con edta



**2° Actividad: Registro de muestra**

- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Toner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.

**4° Actividad: Separación de linfocitos**

- Reactivo para extracción de ARN x 100 mL
- Sodio cloruro 900 mg/100 ml (0.9 %) iny 1 L
- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 mL
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 mL

**5° Actividad: Extracción de ARN y cuantificación**

- Agua para PCR x 500 mL
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L



**PNT.DNCC. INEN. 027. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p210  
V.01**

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

- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Calibrador para ARN para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Tips con filtro 1000 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U



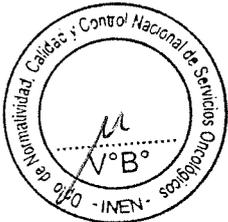
**6° Actividad: Transformación de ARN en molécula cDNA**

- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 uL con tapa x 1000 U



**7° Actividad: Primera amplificación**

- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 U
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 uL con tapa x 1000 U
- Primer bcr/ex13-f 5' - ttcagaagcttccctgacat-3' x 50 nmol
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Primer abl1/ex10-r1 5'- gtactcacagccccacgga-3' x 50 nmol



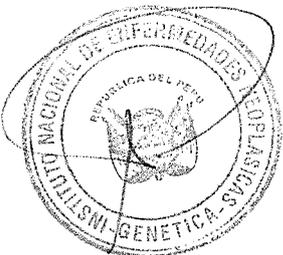
**8° Actividad: Segunda amplificación**

- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 U
- Primer abl1/ex10-r2 5'-cttcgtctgagatactggattcct-3' x 50 nmol
- Primer abl1/ex4-f 5'-aagcgcaacaagcccactgtctat-3' x 50 nmol
- Primer abl1/ex6,7-r 5'-cagtttcgggcagcaagatc-3' x 50 nmol
- Primer abl1/ex6-f 5'-aacgccgtggtgctgctgtac-3' x 50 nmol
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 uL con tapa x 1000 U



**9° Actividad: Preparación de Gel**

- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Buffer tris acetato - edta 10x x 1 L





**PNT.DNCC. INEN. 027. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p210  
V.01**

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

- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000 x 200 uL
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 uL
- Tips 0.5 uL -10 uL x 500 U

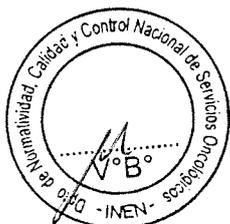
**10° Actividad: Purificación del producto de PCR**

- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U



**11° Actividad: Reacción de secuenciamiento**

- Kit de secuenciamiento bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Primer abl1/ex10-r2 5'-cttcgtctgagatactggattcct-3' x 50 nmol
- Primer abl1/ex4-f 5'-aagcgcaacaagcccactgtctat-3' x 50 nmol
- Primer abl1/ex6,7-r 5'-cagtttcgggcagcaagatc-3' x 50 nmol
- Primer abl1/ex6-f 5'-aacgccgtggctgctgtac-3' x 50 nmol
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 uL con tapa x 1000 U



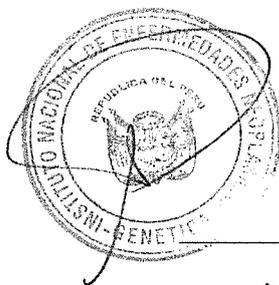
**12° Actividad: Purificación del secuenciamiento**

- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones.
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U



**13° Actividad: Secuenciamiento genético**

- Microplaca de polipropileno 96 pocillos para analizador genético abi 3500
- Polímero pop 7 para analizador genético 3500 sachet para 384 muestras
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Reactivo para condicionamiento analizador genético 3500
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 U
- Septa de placa para analizador genético 3500 de 96 pocillos x 20 U
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 U





**PNT.DNCC. INEN. 027. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p210  
V.01**

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

- Solución tampón (buffer) catodo para analizador genético 3500 x 4 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL x 500

**14° Actividad: Análisis de resultado**

**15° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS**

**9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA**

**10.1. 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).

**10.2. Sistema biológico:**

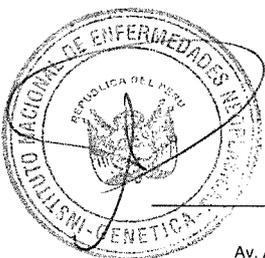
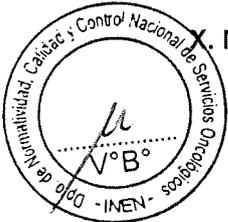
- Ácidos Nucleicos: ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN).

**10.3. Recipiente:**

- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula Ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

**10.4. 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 24 hrs.





**PNT.DNCC. INEN. 027. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p210  
V.01**

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

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

Basado en metodología descrita por Alikian 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) por el personal asignado según encargado del procedimiento, en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica por el personal asignado según encargado del procedimiento y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica (médula ósea) por el personal asignado según encargado del procedimiento.



**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 1077 g/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 100 ng/uL.



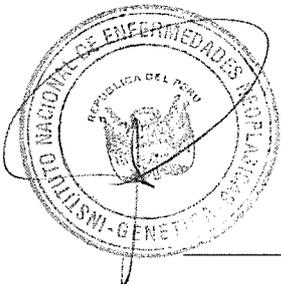
**11.6 Transformación de ARN en Molécula de cADN:**

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 Primera amplificación:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para las regiones del exón 10 del gen ABL1 y el exón 13 del gen BCR por medio de uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad) 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.





**PNT.DNCC. INEN. 027. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p210  
V.01**

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

**11.8 Segunda amplificación:**

Se realiza un segundo proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para las regiones del exón 4, 6 y 10 del gen ABL1 por medio de uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad) 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.

**11.9 Preparación de gel:**

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

**11.10 Purificación del producto de PCR:**

En caso de los productos donde se confirme amplificación, estos pasan al proceso de purificación por medio del kit de purificación de productos de PCR por medio de pasos de centrifugación y lavados; el producto final debe ser cuantificado para determinar adecuada cantidad para la reacción de secuenciamiento.

**11.11 Reacción de secuenciamiento:**

Los productos de la purificación son procesados con el kit de secuenciamiento BigDye terminator y primers específicos para los 4 fragmentos estudiados del gen ABL1, los productos obtenidos son llevados al termociclador para paso por medio de ciclos de calor.

**11.12 Purificación de secuenciamiento:**

Los productos de la reacción de secuenciamiento deben de procesarse con el kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento, el producto obtenido se centrifuga y se recupera el sobrenadante (vol. 90 uL - 100 uL)

**11.13 Secuenciamiento genético:**

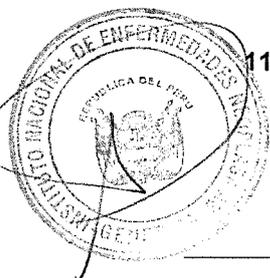
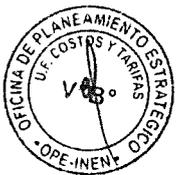
Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, este debe contener la septa de placa y la septa de contenedor ánodo buffer con las soluciones tampón buffer ánodo y cátodo, así como los capilares deben contener el polímero pop 7; luego se da inicio a la electroforesis capilar según el programa BCR-ABL1 TKD.

**11.14 Análisis de resultado:**

Se realiza posterior a la corrida en el analizador genético del cual se exportan las secuencias genéticas en formato FASTA para la evaluación de los electroferogramas, considerando los controles de calidad para definir si la corrida es adecuada; de serlo se comparan las secuencias obtenidas con las secuencias "molde de referencia" para las regiones estudiadas y se comparan ambas secuencias en el software BioEdit; al identificar un variante se anota la ubicación del codón y el aminoácido y luego se determina el cambio del nucleótido y de la proteína. En posterior se realiza el "llamado de variante" para definir la implicancia clínica de esta variante en la resistencia al tratamiento TKI según bibliografía (3) y protocolos internos.

**11.15 Elaboración y entrega de resultado:**

El Biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico, otros exámenes auxiliares y reevalúa el





**PNT.DNCC. INEN. 027. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p210 V.01**

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

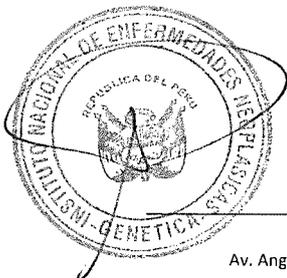
proceso de "llamado de variante" y de ser necesario lleva el caso a reunión de discusión de caso clínico con el grupo de médicos genetistas y biólogos; posteriormente dicho resultado será validado permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Bacarani 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. Alikian M, Gerrard G, Subramanian PG, Mudge K, Foskett P, Khorashad JS, et al. BCR-ABL1 kinase domain mutations: methodology and clinical evaluation. Am J Hematol. 2012 Mar; 87(3):298-304.
3. Soverini S, Branford S, Nicolini FE, Talpaz M, Deininger MWN, Martinelli G, et al. Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia. Leuk Res. 2014 Jan 1; 38(1):10-20.

**X. ANEXO**

- Anexo N° 01. Control de cambios y mejoras.





PERÚ

Sector  
Salud

Instituto Nacional de  
Enfermedades Neoplásicas

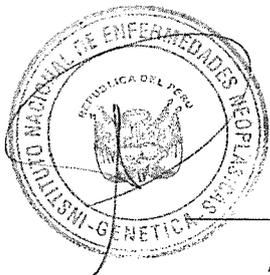
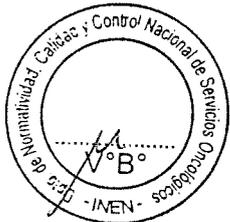


**PNT.DNCC. INEN. 027. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p210  
V.01**

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

**ANEXO N° 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	1-11	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez





**PNT.DNCC. INEN. 028. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL  
p190 V.01**

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

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL  
DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p190**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el Procedimiento de Detección de mutaciones del dominio TK del gen de fusión BCR/ABL p190.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.25
- Código Tarifario INEN: 210761

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección de mutaciones del dominio TK del gen de fusión BCR/ABL p190, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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 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, primer y segunda amplificación, preparación de geles, purificación de productos de PCR, reacción de secuenciamiento, purificación de secuenciamiento, secuenciamiento genético, 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.
- 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**

- 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 Etilendiaminotetraacético (EDTA): Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de

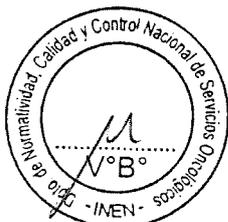


**PNT.DNCC. INEN. 028. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL  
p190 V.01**

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

plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.

- Ácido Nucleico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- Análisis de Fragmentos: Análisis del tamaño y cantidad de fragmentos de DNA amplificados por PCR y marcados con fluorescencia.
- Análisis de Secuenciamiento: Conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.
- 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.
- Muestra de Sangre Periférica: Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Mutaciones TKD: Mutación o cambio en la secuencia del Dominio Tirosina Quinasa (TKD, siglas en inglés) que produce una variación en las características de este.
- PCR – NESTED: Variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación condistintos pares de indicadores en cada una con el fin de incrementar la sensibilidad de detección.
- Punción de Médula Ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- 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.
- 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.



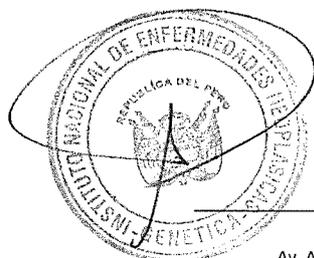
## VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Estudio de búsqueda de mutaciones asociadas a resistencia a las terapias blanco (inhibidores tirosino quinasa) en sospecha a falla a tratamiento, en los casos de las neoplasias mieloproliferativas crónicas y leucemias agudas con detección previa de la presencia del gen de fusión BCR/ABL1 variante p190 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.
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Espectrofotómetro





**PNT.DNCC. INEN. 028. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL  
p190 V.01**

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

- Termociclador
- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- CPU intel core i7-477
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Monitor plano de 20 In
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 btu tipo piso techo



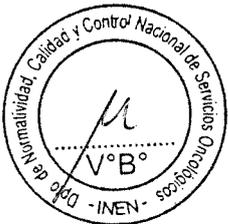
### 7.2 Instrumentales

- Micropipeta volumen variable 0.5 uL - 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL - 200 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL - 1000 uL



### 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

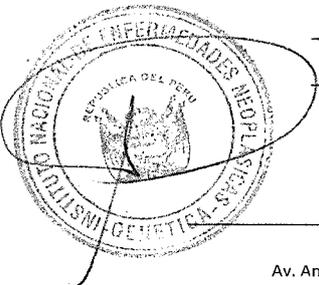


## VIII. SUMINISTROS

### 8.1 Insumos y material:

#### 1° Actividad: Toma de muestra

- 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.





**PNT.DNCC. INEN. 028. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL  
p190 V.01**

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

- 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

**2° Actividad: Registro de Muestra**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Toner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro
- Lapicero de tinta seca punta fina color azul

**3° Actividad: Procesamiento de Muestra**

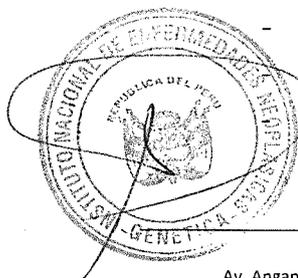
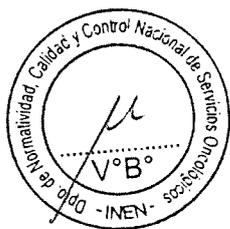
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla M
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar

**4° Actividad: Separación de Linfocitos**

- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 mL
- Sodio cloruro 900 mg/100 mL (0.9%) iny 1 L
- Reactivo para extracción de ARN x 100 mL
- Solución tampón (buffer) para lisis de glóbulos rojos x 100 mL
- Fycoll-Hypaque densidad 1077 g/mL x 100 mL

**5° Actividad: Extracción de ARN y Cuantificación**

- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tips con filtro 1000 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular x 1 L





**PNT.DNCC. INEN. 028. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL  
p190 V.01**

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

- Alcohol etílico (etanol) 98% 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 U
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U

**6° Actividad: Transformación de ARN en molécula cDNA**

- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 µl con tapa x 1000 U
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U



**7° Actividad: Primera amplificación**

- Primer abl1/ex10-r1 5'-gtactcacagccccacgga-3' x 50 nmol
- Primer bcr/ex13-f 5'-ttcagaagcttctccctgacat-3' x 50 nmol
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 U
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 µl x 96 U
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 µl con tapa x 1000 U



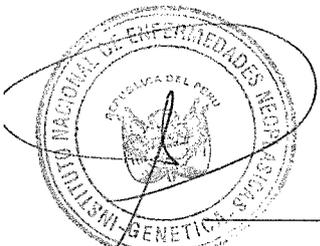
**8° Actividad: Segunda amplificación**

- Primer abl1/ex4-f 5'-aagcgcaacaagcccactgtctat-3' x 50 nmol
- Primer abl1/ex10-r2 5'-cttcgtctgagatactggattcct-3' x 50 nmol
- Primer abl1/ex6-f 5'-aacgccgtggtgctgctgtac-3' x 50 nmol
- Primer abl1/ex6,7-r 5'-cagtttcgggcagcaagatc-3' x 50 nmol
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 U
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 uL con tapa x 1000 U



**9° Actividad: Preparación de gel**

- Marcador de peso molecular (100 pb 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





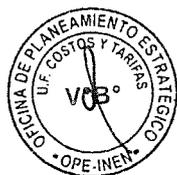
**PNT.DNCC. INEN. 028. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL  
p190 V.01**

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 U

**10° Actividad: Purificación del producto de PCR**

- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Alcohol etílico (etanol) 98% x 2.5 L
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL x 500
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U



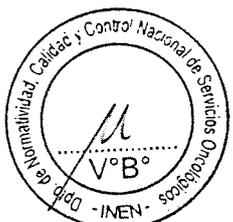
**11° Actividad: Reacción de secuenciamiento**

- Primer abl1/ex4-f 5'-aagcgcaacaagcccactgtctat-3' x 50 nmol
- Primer abl1/ex10-r2 5'-cttctgtctgagatactggattcct-3' x 50 nmol
- Primer abl1/ex6-f 5'-aacgcccgtgtgtgtgtgtac-3' x 50 nmol
- Primer abl1/ex6,7-r 5'-cagtttcgggcagcaagatc-3' x 50 nmol
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 µl con tapa x 1000 U
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U



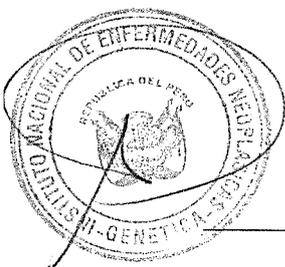
**12° Actividad: Purificación del secuenciamiento**

- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones.
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL x 500 U



**13° Actividad: Secuenciamiento genético**

- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 U
- Solución tampón (buffer) catodo para analizador genético 3500 x 4 U
- Microplaca de polipropileno 96 pocillos para analizador genético abi 3500
- Reactivo para condicionamiento analizador genético 3500
- Polímero pop 7 para analizador genético 3500 sachet para 384 muestras
- Septa de placa para analizador genético 3500 de 96 pocillos x 20 U
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL x 500 U





**PNT.DNCC. INEN. 028. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL  
p190 V.01**

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

**14° Actividad: Análisis de resultado**

**15° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS**

**9.1 Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2 Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA**

**10.1. 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).

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos Nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), Ácido Desoxirribonucleico complementario (CADN)

**10.3. Recipiente:**

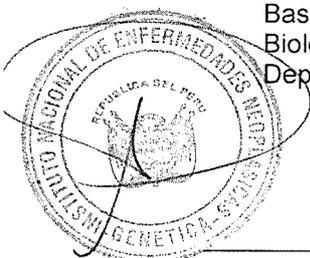
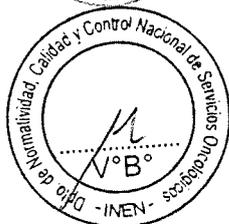
- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula Ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

**10.4. 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 Alikian et al. (2) y protocolos propios del Área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:





**PNT.DNCC. INEN. 028. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL  
p190 V.01**

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 por personal del Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o por Médico Oncólogo del 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 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 1077 g/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 100 ng/uL.

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

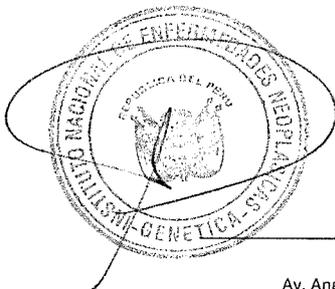
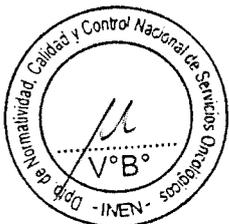
Se añaden los componentes del kit de enzima transcriptasa reversa, la obtención del cADN se dará después de un ciclo de activación en el termociclador.

**11.7 Primera amplificación:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para las regiones del exón 10 del gen ABL1 y el exón 13 del gen BCR por medio de uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad) 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 Segunda amplificación:**

Se realiza un segundo proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para las regiones del exón 4, 6 y 10 del gen ABL1 por medio de uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad) 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.





**PNT.DNCC. INEN. 028. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL  
p190 V.01**

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

**11.9 Preparación de gel:**

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

**11.10 Purificación del producto de PCR:**

En caso de los productos donde se confirme amplificación, estos pasan al proceso de purificación por medio del kit de purificación de productos de PCR por medio de pasos de centrifugación y lavados; el producto final debe ser cuantificado para determinar adecuada cantidad para la reacción de secuenciamiento.

**11.11 Reacción de secuenciamiento:**

Los productos de la purificación son procesados con el kit de secuenciamiento BigDye Terminator y primers específicos para los 4 fragmentos estudiados del gen ABL1, los productos obtenidos son llevados al termociclador para paso por medio de ciclos de calor.

**11.12 Purificación de secuenciamiento:**

Los productos de la reacción de secuenciamiento deben de procesarse con el kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento, el producto obtenido se centrifuga y se recupera el sobrenadante (vol. 90 uL - 100 uL).

**11.13 Secuenciamiento genético:**

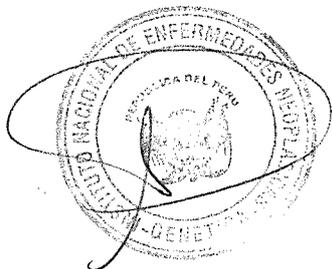
Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, este debe contener la septa de placa y la septa de contenedor ánodo buffer con las soluciones tampón buffer ánodo y cátodo, así como los capilares deben contener el polímero pop 7; luego se da inicio a la electroforesis capilar según el programa BCR-ABL1 TKD.

**11.14 Análisis de resultado:**

Se realiza posterior a la corrida en el analizador genético del cual se exportan las secuencias genéticas en formato FASTA para la evaluación de los electroferogramas, considerando los controles de calidad para definir si la corrida es adecuada; de serlo se comparan las secuencias obtenidas con las secuencias "molde de referencia" para las regiones estudiadas y se comparan ambas secuencias en el software BioEdit; al identificar un variante se anota la ubicación del codón y el aminoácido, luego se determina el cambio del nucleótido y de la proteína. En posterior se realiza el "llamado de variante" para definir la implicancia clínica de esta variante en la resistencia al tratamiento TKI según bibliografía (3) y protocolos internos.

**11.15 Elaboración y entrega de resultado:**

El biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico, otros exámenes auxiliares y reevalúa el proceso de "llamado de variante" y de ser necesario lleva el caso a reunión de discusión de caso clínico con el grupo de médicos genetistas y biólogos; en posterior dicho resultado será validado permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.





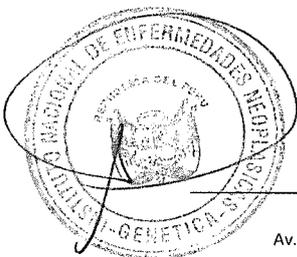
**PNT.DNCC. INEN. 028. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL p190 V.01**  
 Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
 Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Bacarani 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. Alikian M, Gerrard G, Subramanian PG, Mudge K, Foskett P, Khorashad JS, et al. BCR-ABL1 kinase domain mutations: methodology and clinical evaluation. Am J Hematol. 2012 Mar; 87(3):298-304.
3. Soverini S, Branford S, Nicolini FE, Talpaz M, Deininger MW, Martinelli G, et al. Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia. Leuk Res. 2014 Jan 1; 38(1):10-20.

**XIII. ANEXO. –**

- Anexo N° 01. Control de cambios y mejoras.





PERÚ

Sector  
Salud

Instituto Nacional de  
Enfermedades Neoplásicas

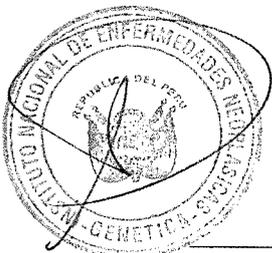


**PNT.DNCC. INEN. 028. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL DOMINIO TK DEL GEN DE FUSIÓN BCR/ABL  
p190 V.01**

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

**ANEXO N° 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	1-11	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez





**PNT.DNCC. INEN. 029. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN RET (EXONES 10, 11, 13, 14, 15 y 16) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**

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

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN  
EL GEN RET (EXONES 10, 11, 13, 14, 15 y 16) POR SECUENCIAMIENTO**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de mutaciones en el gen RET (exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16) por secuenciamiento sanger.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSa): 88299.28
- Código Tarifario INEN: 210756

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento la Detección de mutaciones en el gen RET (exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16) por secuenciamiento, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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, realiza la revisión del caso y de las variantes encontradas, así como válida los resultados impresos en físico.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ADN, amplificación por PCR, preparación de geles, purificación de productos de PCR, reacción de secuenciamiento, purificación de secuenciamiento, secuenciamiento genético, 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.
- 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.

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

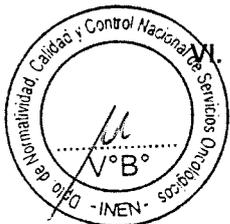
- Ácido Desoxirribonucleico (ADN): Es un Ácido Nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA): Es un agente quelante usado como 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.
- Ácido Nucleico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.



**PNT.DNCC. INEN. 029. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN RET (EXONES 10, 11, 13, 14, 15 y 16) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**

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

- Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de transmisión de genes y síntesis de proteínas.
- Análisis de secuenciamiento: Conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.
- 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.
- Línea Germinal: Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores.
- Muestra de sangre periférica: Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- PCR – NESTED: Variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de indicadores en cada una con el fin de incrementar la sensibilidad de detección.
- Punción de Médula Ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- 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.
- 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.



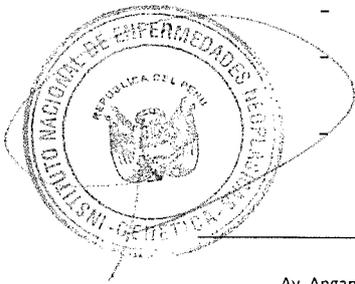
### SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Estudio de búsqueda de variantes patogénicas y/o probablemente patogénica en línea germinal en pacientes/familias con sospecha clínica de síndromes de predisposición genética a cáncer medular de tiroides (1) para confirmar el diagnóstico molecular y definir estrategias de control de riesgos y reducción de riesgos, así como el manejo de familiares.

### VII. EQUIPAMIENTO

#### 7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático)

- Analizador genético automatizado
- Balanza pequeña digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Cámara fotográfica digital
- Centrífuga para tubos.
- Computadora
- Congeladora de metal, color plomo
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 18 000 btu/H tipo mini split decorativo.
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24 000 btu/H tipo mini split decorativo.





**PNT.DNCC. INEN. 029. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN RET (EXONES 10, 11, 13, 14, 15 y 16) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**

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

- Espectrofotómetro
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrifuga
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Termociclador
- Transiluminador
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.



### 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



### 7.3 Mobiliario

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

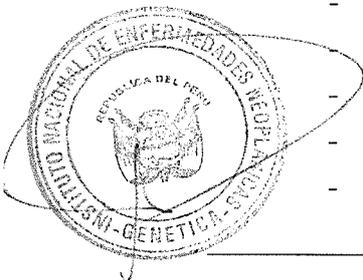


## VIII. SUMINISTROS

### 8.1 Insumos y material:

#### 1° Actividad: Toma de Muestra

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S





**PNT.DNCC. INEN. 029. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN RET (EXONES 10, 11, 13, 14, 15 y 16) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**

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

- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con EDTA

**2° Actividad: Registro de muestra**

- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Toner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

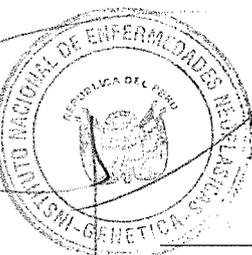
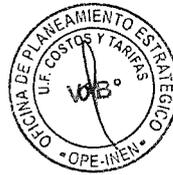
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.

**4° Actividad: Extracción de ADN y cuantificación**

- Alcohol etílico (Etanol) 98% x 2.5 L
- Alcohol isopropílico (Isopropanol) P.A. x 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U

**5° Actividad: Amplificación por PCR de región de interés**

- Primer Ret Ex10F: 5'-Ctatgcttgacaccagcttg-3' X 1000 Determinaciones
- Primer Ret Ex10R: 5'-Ctctgggtggagtaacagag-3' X 1000 Determinaciones
- Primer Ret Ex11F: 5'-Cagagcatagcagcctgtac-3' X 1000 Determinaciones





**PNT.DNCC. INEN. 029. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN RET (EXONES 10, 11, 13, 14, 15 y 16) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**

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

- Primer Ret Ex11R: 5'-Gcctgctgcccagcgttg-3' X 1000 Determinaciones
- Primer Ret Ex13F: 5'-Agaagcctcaagcagcatcgtc-3' X 1000 Determinaciones
- Primer Ret Ex13R: 5'-Aggagcagtagggaaagggaga-3' X 1000 Determinaciones
- Primer Ret Ex14F: 5'-Gaagaccaagctgcctgac-3' X 1000 Determinaciones
- Primer Ret Ex14R: 5'-Ggctagagtgtggcatgttg-3' X 1000 Determinaciones
- Primer Ret Ex15F: 5'-Ggtctcaccaggccgctac-3' X 1000 Determinaciones
- Primer Ret Ex15R: 5'-Tcggtatcttctcctaggcttc-3' X 1000 Determinaciones
- Primer Ret Ex16F: 5'-Agggatagggcctgccttc-3' X 1000 Determinaciones
- Primer Ret Ex16R: 5'-Ccgaccattgctcctcacgaac-3' X 1000 Determinaciones
- Enzima Taq ADN Polimerasa Termoactivable De Alta Fidelidad X 100 U
- Deoxinucleótidos Dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 Mm (Kit)
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96 U
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 uL con tapa x 1000 U

**6° Actividad: Preparación de gel**

- Agarosa grado biología molecular X 500 g
- Alcohol etílico (Etanol) 98% X 2.5 L
- Buffer tris acetato - Edta 10X X 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000X X 200 UI
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Marcador de peso molecular (100Pb Ladder) X 250 UI
- Tips 0.5 UI -10 UI X 500 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI X 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500 U

**7° Actividad: Purificación de productos PCR**

- Alcohol etílico (Etanol) 98% X 2.5 L
- Kit para purificación de productos de PCR X 100 determinaciones
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL X 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI X 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI X 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500 U

**8° Actividad: Segunda amplificación**

- Primer Ret Ex10F: 5'-Ctatgcttgcgacaccagttg-3' X 1000 determinaciones
- Primer Ret Ex10R: 5'-Ctctgggtggagtaacagag-3' X 1000 determinaciones
- Primer Ret Ex11F: 5'-Cagagcatacgcagcctgtac-3' X 1000 determinaciones



**PNT.DNCC. INEN. 029. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN RET (EXONES 10, 11, 13, 14, 15 y 16) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**

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

- Primer Ret Ex11R: 5'-Gcctcgtctgccagcgttg-3' X 1000 determinaciones
- Primer Ret Ex13F: 5'-Agaagcctcaagcagcatcgtc-3' X 1000 determinaciones
- Primer Ret Ex13R: 5'-Aggagcagtagggaaagggaga-3' X 1000 determinaciones
- Primer Ret Ex14F: 5'-Gaagaccaagctgcctgac-3' X 1000 determinaciones
- Primer Ret Ex14R: 5'-Ggctagagtgtggcatggtg-3' X 1000 determinaciones
- Primer Ret Ex15F: 5'-Ggtctcaccaggccgctac-3' X 1000 determinaciones
- Primer Ret Ex15R: 5'-Tcggtatcttctcaggcttc-3' X 1000 determinaciones
- Primer Ret Ex16F: 5'-Agggatagggcctggccttc-3' X 1000 determinaciones
- Primer Ret Ex16R: 5'-Ccgccatttgctcacaac-3' X 1000 determinaciones
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator V3.1 X 100 reacciones
- Tubo de Polipropileno para PCR de 200 uL con tapa X 1000
- Tips Estéril con Filtro 0.1 UI - 10 UI X 96 U
- Tips Estéril con Filtro 20 UI - 200 UI X 96 U
- Puntera (Tips) Estéril con Filtro 2 uL - 20 uL X 96 U

**9° Actividad: Purificación de secuenciamiento**

- Kit para Purificación de productos de Reacción de Secuenciamiento X 100 Determinaciones.
- Puntera (Tips) Estéril con Filtro 2 uL - 20 uL X 96 U
- Tips Estéril con Filtro 0.1 UI - 10 UI X 96 U
- Tips Estéril con Filtro 20 UI - 200 UI X 96 U
- Tubo de Polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL X 500 U

**10° Actividad: Secuenciamiento genético**

- Microplaca de Polipropileno 96 Pocillos para Analizador Genético Abi 3500
- Polímero Pop 7 para Analizador Genético 3500 Sachet para 384 Muestras
- Reactivo para condicionamiento Analizador Genético 3500
- Septa Contenedor Buffer Catodo Para Analizador Genético 3500 X 10 U
- Septa de Placa para Analizador Genético 3500 de 96 Pocillos X 20 U
- Solución Tampón (Buffer) Anodo para Analizador Genético 3500 X 4 U
- Solución Tampón (Buffer) Cátodo para Analizador Genético 3500 X 4 U
- Tips Estéril con Filtro 20 UI - 200 UI X 96 U

**11° Actividad: Análisis de resultado**

**12° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS**

**9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de equipamiento:



**PNT.DNCC. INEN. 029. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN RET (EXONES 10, 11, 13, 14, 15 y 16) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**

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

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA**

**10.1. 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.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos Nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), Ácido Desoxirribonucleico complementario (cADN)

**10.3. Recipiente:**

- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

**10.4. 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 24 hrs.

**MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Basado en metodología descrita por Alikian 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).

**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 de ADN y cuantificación:**

Se realiza a partir de 200 uL de sangre total por medio del kit de extracción de ADN genómico y el método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ADN)



**PNT.DNCC. INEN. 029. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN RET (EXONES 10, 11, 13, 14, 15 y 16) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**

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

cuantificación que se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 600 ng/uL.

**11.5 Amplificación por PCR de región de interés:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para los exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16 del gen RET por medio de uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad) 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.

**11.6 Preparación de Gel:**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (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) para evidenciar la amplificación de las regiones buscadas.

**11.7 Purificación del producto de PCR:**

En caso de los productos donde se confirme amplificación, estos pasan al proceso de purificación por medio del kit de purificación de productos de PCR por medio de pasos de centrifugación y lavados; el producto final debe ser cuantificado para determinar adecuada cantidad para la reacción de secuenciamiento.

**11.8 Reacción de secuenciamiento:**

Los productos de la purificación son procesados con el Kit de secuenciamiento BigDye terminator y primers específicos para los 6 exones específicos del gen RET, los productos obtenidos son llevados al termociclador para paso por medio de ciclos de calor.

**11.9 Purificación de secuenciamiento:**

Los productos de la reacción de secuenciamiento deben de procesarse con el kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento, el producto obtenido se centrifuga y se recupera el sobrenadante (vol. 90 - 100 uL).

**11.10 Secuenciamiento genético:**

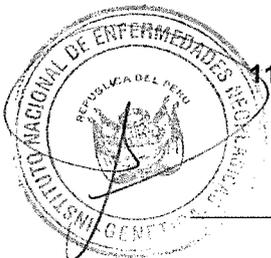
Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, este debe contener la septa de placa y la septa de contenedor ánodo buffer con las soluciones tampón buffer ánodo y cátodo, así como los capilares deben contener el Polímero Pop 7; luego se da inicio a la electroforesis capilar corrida según el programa específico para el gen estudiado.

**11.11 Análisis de resultado:**

Se realiza posterior a la corrida en el analizador genético del cual se exportan las secuencias genéticas en formato *FASTA* para la evaluación de los electroferogramas, considerando los controles de calidad para definir si la corrida es adecuada; de serlo se comparan las secuencias obtenidas con las secuencias "molde de referencia" para las regiones estudiadas (Alineamiento) y se comparan ambas secuencias en el software BioEdit; al identificar un variante se anota la ubicación del codón y el aminoácido y luego se determina el cambio del nucleótido y de la proteína. En posterior se realiza el proceso de "llamado de variante" para definir la categoría clínica de la variante según bibliografía (4) y protocolos internos.

**11.12 Elaboración y entrega de resultado:**

El biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en este caso al tratarse de pruebas de alta confidencialidad, se realizará en formato interno; el médico





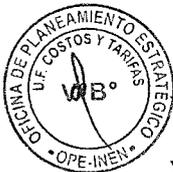
**PNT.DNCC. INEN. 029. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN RET (EXONES 10, 11, 13, 14, 15 y 16) POR SECUENCIAMIENTO V.01**

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

genetista a cargo evalúa el caso clínico, otros exámenes auxiliares y reevalúa el proceso de "llamado de variante"; luego se lleva el caso a reunión de discusión de caso clínico con el grupo de médicos genetistas y biólogos concluyendo el caso y procediendo a la validación múltiple (caso debe ser validado por 3 médicos genetistas) y su posterior impresión.

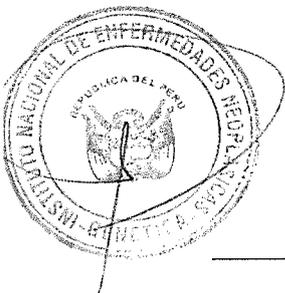
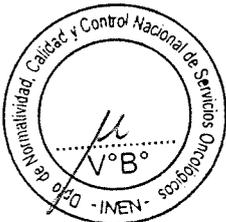
**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Wells SA, Asa SL, Dralle H, Elisei R, Evans DB, Gagel RF, et al. Revised American Thyroid Association Guidelines for the Management of Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid*. 2015 Jun 1;25(6):567–610.
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931–45
3. Mathiesen JS, Kroustrup JP, Vestergaard P, Stochholm K, Poulsen PL, Rasmussen ÅK, et al. Distribution of RET Mutations in Multiple Endocrine Neoplasia 2 in Denmark 1994-2014: A Nationwide Study. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc*. 2017;27(2):215–23.
4. Richards et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24.



**XIII. ANEXOS**

- Anexo N° 01. Control de cambios y mejoras.



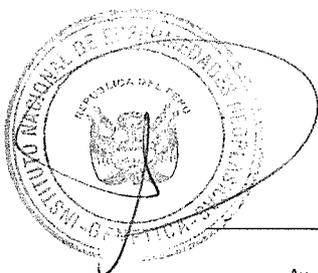
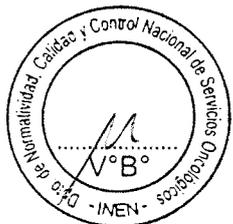
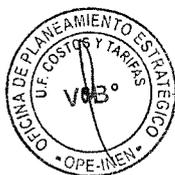


PNT.DNCC. INEN. 029. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN RET (EXONES 10, 11, 13, 14, 15 y 16) POR SECUENCIAMIENTO V.01

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

ANEXO N° 01: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

Table with 5 columns: VERSIÓN, PÁGINA, DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA, FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN), and AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN). Row 1: 01, 1-10, Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC...





**PNT.DNCC. INEN. 030. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN VHL (EXONES 1, 2 Y 3) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**

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

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN  
EL GEN VHL (EXONES 1, 2 Y 3) POR SECUENCIAMIENTO**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de mutaciones en el gen VHL (exones 1, 2 y 3) por secuenciamiento Sanger.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSAs): 88299.33
- Código Tarifario INEN: 210755

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección de mutaciones en el gen VHL (exones 1, 2 y 3) por secuenciamiento, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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, realiza la revisión del caso y de las variantes encontradas, así como valida los resultados impresos en físico.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ADN, amplificación por PCR, preparación de geles, purificación de productos de PCR, reacción de secuenciamiento, purificación de secuenciamiento, secuenciamiento genético, 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.
- 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.

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- 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 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.

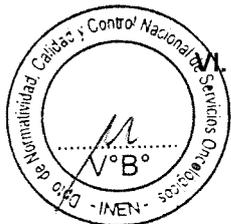
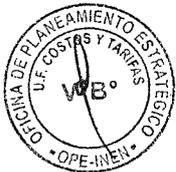
Ácido Nucléico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.



## PNT.DNCC. INEN. 030. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN VHL (EXONES 1, 2 Y 3) POR SECUENCIAMIENTO V.01

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

- Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de transmisión de genes y síntesis de proteínas.
- Análisis de secuenciamiento: Conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.
- 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.
- Línea Germinal: Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores.
- Muestra de Sangre Periférica: Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- 巢標- NESTED: Variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de indicadores en cada una con el fin de incrementar la sensibilidad de detección.
- Punción de Médula Ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- 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.
- 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.



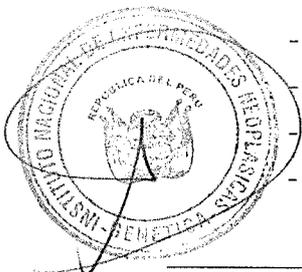
### VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Estudio de búsqueda de variantes patogénicas y/o probablemente patogénica en línea germinal en pacientes/familias con sospecha clínica del Síndrome de Von Hippel Lindau (1) para confirmar el diagnóstico molecular y definir estrategias de control de riesgos y reducción de riesgos, así como el manejo de familiares.

### VII. EQUIPAMIENTO

#### 7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Microcentrífuga
- Espectrofotómetro
- Congeladora de metal, color plomo
- Termociclador
- Analizador genético automatizado
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital

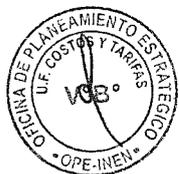


**PNT.DNCC. INEN. 030. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN VHL (EXONES 1, 2 Y 3) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

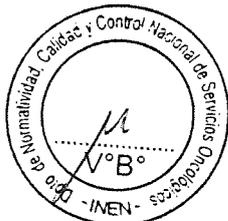
- Transiluminador
- Computadora
- CPU intel core i7-477
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Monitor plano de 20 In
- Teclado Keyboard con puerto USB
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 18000 btu/H tipo mini split decorativo.
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 btu/H tipo mini split decorativo.

**7.2 Instrumentales**

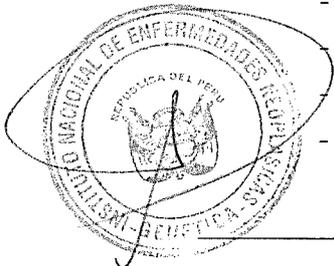
- Micropipeta volumen variable 0.5 uL - 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL - 200 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 1000 uL

**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

**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:****1° Actividad: Toma de muestra**

- 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



**PNT.DNCC. INEN. 030. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN VHL (EXONES 1, 2 Y 3) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- 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

**2° Actividad: Registro de muestra**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Toner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul

**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

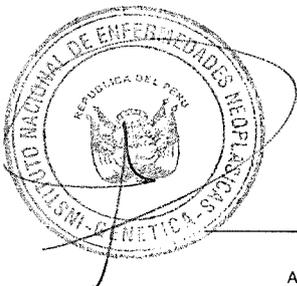
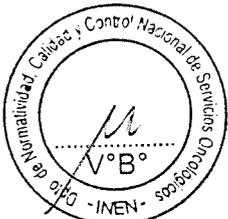
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla M
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla estándar

**4° Actividad: Extracción de ADN y cuantificación**

- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL x 500 U
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Alcohol isopropílico (Isopropanol) P.A. x 2.5 L
- Alcohol etílico (Etanol) 98% x 2.5 L
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit X 100 determinaciones

**5° Actividad: Amplificación por PCR de región de interés**

- Primer Vhl Ex1F: 5'-Cgaagactacggaggtcgac-3' X 1000 determinaciones
- Primer Vhl Ex1R: 5'-Ggcttcagaccgtgctatcg-3' X 1000 determinaciones
- Primer Vhl Ex2 F: 5'-Attacaggtgtggccaccg-3' X 1000 determinaciones



**PNT.DNCC. INEN. 030. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN VHL (EXONES 1, 2 Y 3) POR SECUENCIAMIENTO V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Primer Vhl Ex2 R: 5'-Gcctgacatcaggcaaaaattgag-3' X 1000 determinaciones
- Primer Vhl Ex3 F: 5'-Ccttgactgagaccctag-3' X 1000 determinaciones
- Primer Vhl Ex3 R: 5'-Gctgagatgaaacagtgtgta-3' X 1000 determinaciones
- Enzima Taq ADN Polimerasa termoactivable de alta fidelidad X 100 U
- Deoxinucleótidos Dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 Mm (Kit)
- Tips Estéril con Filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tips Estéril con Filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 uL con tapa x 1000 U

**6° Actividad: Preparación de Gel**

- Marcador de peso molecular (100Pb Ladder) x 250 UI
- Buffer tris acetato - Edta 10X x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000X x 200 UI
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Tips 0.5 UI - 10 UI x 500 U

**7° Actividad: Purificación de productos PCR**

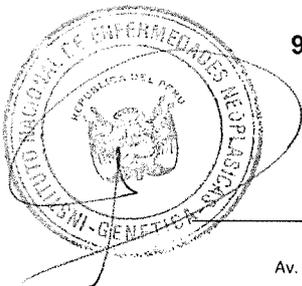
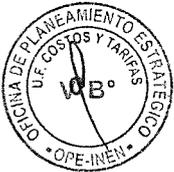
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Alcohol Etilico (Etanol) 98% x 2.5 L
- Tubo de Polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL x 500
- Tips Estéril con Filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tips Estéril con Filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Puntera (Tips) Estéril con Filtro 2 uL - 20 uL x 96 U

**8° Actividad: Reacción de secuenciamiento**

- Primer Vhl Ex1F: 5'-Cgaagactacggaggtcgac-3' x 1000 determinaciones
- Primer Vhl Ex1R: 5'-Ggcttcagaccgtgctatcg-3' x 1000 determinaciones
- Primer Vhl Ex2 F: 5'-Attacaggtgtggccaccg-3' x 1000 determinaciones
- Primer Vhl Ex2 R: 5'-Gcctgacatcaggcaaaaattgag-3' x 1000 determinaciones
- Primer Vhl Ex3 F: 5'-Ccttgactgagaccctag-3' x 1000 determinaciones
- Primer Vhl Ex3 R: 5'-Gctgagatgaaacagtgtgta-3' x 1000 determinaciones
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator V3.1 x 100 reacciones
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 µl con tapa x 1000 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U

**9° Actividad: Purificación de secuenciamiento**

- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento X 100 determinaciones.





**PNT.DNCC. INEN. 030. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN VHL (EXONES 1, 2 Y 3) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**

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 UI - 10 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U

**10° Actividad: Secuenciamiento Genético**

- Solución tampón (Buffer) ánodo para analizador genético 3500 X 4 U
- Solución tampón (Buffer) catodo para analizador genético 3500 X 4 U
- Microplaca de polipropileno 96 pocillos para analizador genético abi 3500
- Reactivo para condicionamiento analizador genético 3500
- Polímero pop 7 para analizador genético 3500 sachet para 384 muestras
- Septa de placa para analizador genético 3500 de 96 pocillos x 20 U
- Septa contenedor buffer catodo para analizador genético 3500 x 10 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Puntera (Tips) Estéril con Filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500 U
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético Abl 3500
- Tips estéril con filtro 0.1 UI-10 UI x 96 U

**11° Actividad: Análisis de resultado**

**12° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS**

**9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA**

**10.1. 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.



**PNT.DNCC. INEN. 030. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN VHL (EXONES 1, 2 Y 3) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**

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

**10.2. Sistema biológico:**

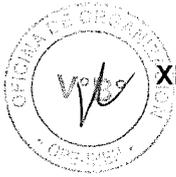
- Ácidos Nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), Ácido Desoxirribonucleico complementario (cADN).

**10.3. Recipiente:**

- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

**10.4. 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 24 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2 – 8 °C.

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

Basado en metodología descrita previamente (2)(3)(4) 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 por el personal del Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica).

**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.

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación:**

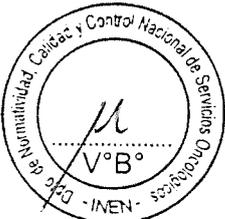
Se realiza a partir de 200 uL de sangre total por medio del kit de extracción de ADN genómico y el método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ADN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 600 ng/uL.

**11.5 Amplificación por PCR de región de interés:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para los exones 1, 2 y 3 del gen VHL por medio de uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad) 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.

**11.6 Preparación de Gel:**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (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) para evidenciar la amplificación de las regiones buscadas.





**PNT.DNCC. INEN. 030. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN VHL (EXONES 1, 2 Y 3) POR  
SECUENCIAMIENTO V.01**

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

**11.7 Purificación del producto de PCR:**

En caso de los productos donde se confirme amplificación, estos pasan al proceso de purificación por medio del kit de Purificación de productos de PCR por medio de pasos de centrifugación y lavados; el producto final debe ser cuantificado para determinar adecuada cantidad para la reacción de secuenciamiento.

**11.8 Reacción de secuenciamiento:**

Los productos de la purificación son procesados con el kit de secuenciamiento BigDye Terminator y primers específicos para los 3 exones del gen VHL, los productos obtenidos son llevados al termociclador para paso por medio de ciclos de calor.

**11.9 Purificación de secuenciamiento:**

Los productos de la reacción de secuenciamiento deben de procesarse con el kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento, el producto obtenido se centrifuga y se recupera el sobrenadante (vol. 90 - 100 uL).

**11.10 Secuenciamiento genético:**

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, este debe contener la septa de placa y la septa de contenedor ánodo buffer con las soluciones tampón buffer Ánodo y Cátodo, así como los capilares deben contener el Polímero Pop 7; luego se da inicio a la electroforesis capilar corrida según el programa específico para el gen estudiado.

**11.11 Análisis de resultado:**

Se realiza posterior a la corrida en el analizador genético del cual se exportan las secuencias genéticas en formato FASTA para la evaluación de los electroferogramas, considerando los controles de calidad para definir si la corrida es adecuada; de serlo se comparan las secuencias obtenidas con las secuencias "molde de referencia" para las regiones estudiadas (Alineamiento) y se comparan ambas secuencias en el software BioEdit; al identificar un variante se anota la ubicación del codón y el aminoácido y luego se determina el cambio del nucleótido y de la proteína. En posterior se realiza el proceso de "llamado de variante" para definir la categoría clínica de la variante según bibliografía (5) y protocolos internos.

**11.12 Elaboración y entrega de resultado:**

El biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en este caso al tratarse de pruebas de alta confidencialidad, se realizará en formato interno; el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico, otros exámenes auxiliares y reevalúa el proceso de "llamado de variante"; luego se lleva el caso a reunión de discusión de caso clínico con el grupo de médicos genetistas y biólogos concluyendo el caso y procediendo a la validación múltiple (caso debe ser validado por 3 médicos genetistas) y su posterior impresión.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Nielsen SM, Rhodes L, Blanco I, Chung WK, Eng C, Maher ER, et al. Von Hippel-Lindau Disease: Genetics and Role of Genetic Counseling in a Multiple Neoplasia Syndrome. J Clin Oncol. 2016 Apr 25;34(18):2172–81
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 2004 Oct 21;431(7011):931–45
3. Pastore YD, Jelinek J, Ang S, Guan Y, Liu E, Jedlickova K, et al. Mutations in the VHL gene in sporadic apparently congenital polycythemia. Blood. 2003 Feb 15;101(4):1591–5.



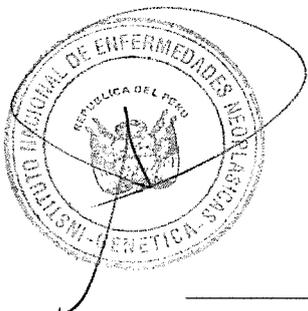
**PNT.DNCC. INEN. 030. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN VHL (EXONES 1, 2 Y 3) POR SECUENCIAMIENTO V.01**

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

- 4. Coppin L, Grutzmacher C, Crépin M, Destailleur E, Giraud S, Cardot-Bauters C, et al. VHL mosaicism can be detected by clinical next-generation sequencing and is not restricted to patients with a mild phenotype. Eur J Hum Genet EJHG. 2014 Sep; 22(9):1149–52.
- 5. Richards et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May; 17(5):405-24.

**XIII. ANEXOS**

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



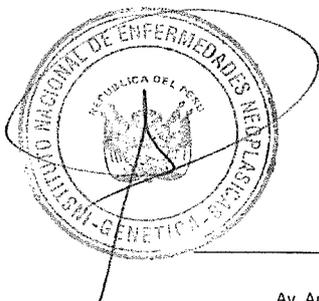
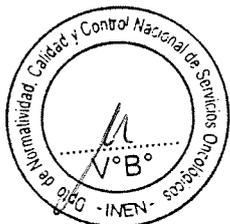
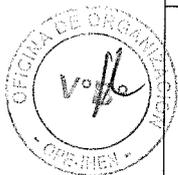


PNT.DNCC. INEN. 030. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN VHL (EXONES 1, 2 Y 3) POR SECUENCIAMIENTO V.01

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

ANEXO N° 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

Table with 5 columns: VERSIÓN, PÁGINA, DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA, FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN), and AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN). Row 1: 01, 1-10, Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC...



**PNT.DNCC. INEN. 031. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN PUNTUAL EN EL GEN BRCA1/2 POR SECUENCIAMIENTO V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN PUNTUAL EN EL GEN BRCA1/2 POR SECUENCIAMIENTO****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de mutación puntual en el gen BRCA1/2 por secuenciamiento Sanger.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81211
- Código Tarifario INEN: 210753

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección de mutación puntual en el gen BRCA1/2 por secuenciamiento, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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, y realiza la revisión del caso y de las variantes encontradas, así como valida los resultados impresos en físico.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ADN, amplificación por PCR, preparación de geles, purificación de productos de PCR, reacción de secuenciamiento, purificación de secuenciamiento, secuenciamiento genético, 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.
- 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.

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- 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 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.
- Ácido Nucleico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.

**PNT.DNCC. INEN. 031. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN PUNTUAL EN EL GEN BRCA1/2 POR SECUENCIAMIENTO V.01**

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

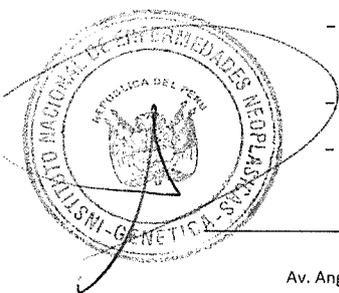
- Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- Análisis de Secuenciamiento.- Conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.
- 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.
- Línea Germinal: Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores.
- Muestra de Sangre Periférica: Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- PCR – NESTED: Variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de indicadores en cada una con el fin de incrementar la sensibilidad de detección.
- Punción de Médula Ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- 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.
- 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.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de búsqueda de variantes patogénicas y/o probablemente patogénico familiar en familiares de pacientes con diagnóstico de síndrome de cáncer de mama/ovario hereditario (1), para identificar individuos portadores de estas variantes y según eso definir estrategias de control de riesgos y reducción de riesgos en estos portadores.

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

- Analizador genético automatizado
- Balanza pequeña digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Cámara fotográfica digital
- Centrífuga para tubos
- Computadora
- Congeladora de metal, color plomo
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 18 000 btu/H tipo mini split decorativo.
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24 000 btu/H tipo piso techo.
- Espectrofotómetro



**PNT.DNCC. INEN. 031. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN PUNTUAL EN EL GEN BRCA1/2 POR SECUENCIAMIENTO V.01**

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

- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Impresora de código de barras térmicas 102mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrifuga
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Termociclador
- Transiluminador
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.

**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

**7.3 Mobiliario**

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

**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:****1° Actividad: Toma de muestra**

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S

**PNT.DNCC. INEN. 031. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN PUNTUAL EN EL GEN BRCA1/2 POR SECUENCIAMIENTO V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

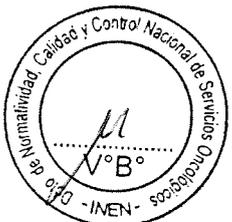
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA

**2° Actividad: Registro de muestra**

- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Toner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

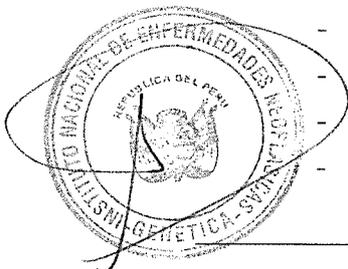
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.

**4° Actividad: Extracción de ADN y cuantificación**

- Alcohol etílico (Etanol) 98% x 2.5 L
- Alcohol isopropílico (Isopropanol) P.A. x 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Tips con filtro 1000 UI x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U

**5° Actividad: Amplificación por PCR de región de interés**

- Deoxinucleótidos Dntps 4 X 40 Umol en concentración 100 Mm (Kit)
- Enzima Taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 U
- Primer Brca1/2 de región específica según antecedente familiar.
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U



**PNT.DNCC. INEN. 031. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN PUNTUAL EN EL GEN BRCA1/2 POR SECUENCIAMIENTO V.01**

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

- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 µl con tapa x 1000 U

**6° Actividad: Preparación de gel**

- Agarosa grado biología molecular x 500 G
- Buffer tris acetato - edta 10X x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000X x 200 UI
- Marcador de peso molecular (100Pb Ladder) x 250 UI
- Tips 0.5 UI -10 UI x 500 U

**7° Actividad: Purificación de productos PCR**

- Alcohol etílico (Etanol) 98.0% x 2.5 L
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U

**8° Actividad: Reacción de secuenciamiento**

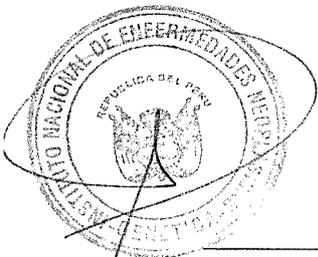
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator V3.1 x 100 reacciones
- Primer Brca1/2 de región específica según antecedente familiar.
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 uL con tapa x 1000 U

**9° Actividad: Purificación de secuenciamiento**

- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones.
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500 U

**10° Actividad: Secuenciamiento genético**

- Arreglo de 8 capilares para analizador genético abi 3500
- Microplaca de polipropileno 96 pocillos para analizador genético Abi 3500
- Polímero pop 7 para analizador genético 3500 sachet para 384 muestras
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL X 96 U
- Reactivo para condicionamiento analizador genético 3500
- Septa contenedor buffer catodo para analizador genético 3500 x 10 U
- Septa de placa para analizador genético 3500 de 96 pocillos x 20 U
- Solución tampón (Buffer) ánodo para analizador genético 3500 X 4 U



**PNT.DNCC. INEN. 031. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN PUNTUAL EN EL GEN BRCA1/2 POR SECUENCIAMIENTO V.01**

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

- Solución tampón (Buffer) catodo para analizador genético 3500 X 4 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI X 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI X 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 MI X 500

**11° Actividad: Análisis de resultado****12° Actividad: Elaboración y Entrega de Resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. 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.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos Nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), Ácido Desoxirribonucleico complementario (cADN).

**10.3. Recipiente:**

- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

**10.4. Manejo:**

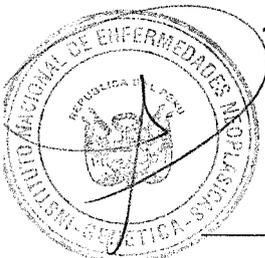
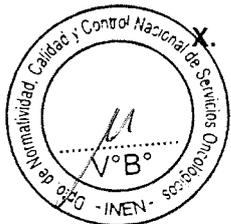
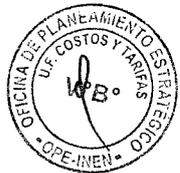
- Es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente hasta 24 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2 - 8 °C.

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

Basado en metodología descrita previamente (2) (3) 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 por el personal del Área de Trabajo Toma Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica).



**PNT.DNCC. INEN. 031. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN PUNTUAL EN EL GEN BRCA1/2 POR SECUENCIAMIENTO V.01**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/a.

**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.

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación:**

Se realiza a partir de 200 uL de sangre total por medio del kit de extracción de ADN genómico y el método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ADN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 600 ng/uL.

**11.5 Amplificación por PCR de región de interés:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para la región de exón específica según antecedente familiar de los genes BRCA1/2 por medio de uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad) 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.

**11.6 Preparación de Gel:**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (TAE) que nos ayudará a analizar el amplicón (productos obtenidos del proceso de la amplificación) por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN) para evidenciar la amplificación de las regiones buscadas.

**11.7 Purificación del producto de PCR:**

En caso de los productos donde se confirme amplificación, estos pasan al proceso de purificación por medio del kit de Purificación de productos de PCR por medio de pasos de centrifugación y lavados; el producto final debe ser cuantificado para determinar adecuada cantidad para la reacción de secuenciamiento.

**11.8 Reacción de secuenciamiento:**

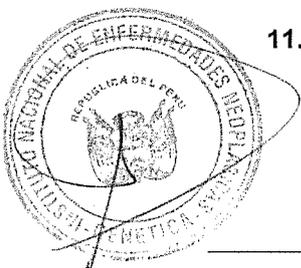
Los productos de la purificación son procesados con el Kit de secuenciamiento BigDye Terminator y primers específicos para la región de exón específica según antecedente familiar de los genes BRCA1/2, los productos obtenidos son llevados al termociclador para paso por medio de ciclos de calor.

**11.9 Purificación de secuenciamiento:**

Los productos de la reacción de secuenciamiento deben de procesarse con el kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento, el producto obtenido se centrifuga y se recupera el sobrenadante (vol. 90 – 100 uL).

**11.10 Secuenciamiento genético:**

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, este debe contener la septa de placa y la septa de contenedor ánodo buffer con las soluciones tampón buffer ánodo y cátodo, así





**PNT.DNCC. INEN. 031. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN PUNTUAL EN EL GEN BRCA1/2 POR SECUENCIAMIENTO V.01**

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

como los capilares deben contener el polímero pop 7; luego se da inicio a la electroforesis capilar corrida según el programa específico para el gen estudiado.

**11.11 Análisis de resultado:**

Se realiza posterior a la corrida en el analizador genético del cual se exportan las secuencias genéticas en formato FASTA para la evaluación de los electroferogramas, considerando los controles de calidad para definir si la corrida es adecuada; de serlo se comparan las secuencias obtenidas con las secuencias "molde de referencia" para las regiones estudiadas (alineamiento) y se comparan ambas secuencias en el software BioEdit para definir la presencia/ausencia de la variante buscada luego se define categoría clínica de la variante según bibliografía (4) y protocolos internos.



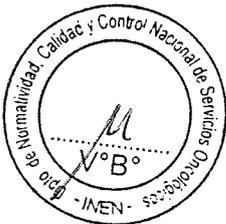
**11.12 Elaboración y entrega de resultado:**

El biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en este caso al tratarse de pruebas de alta confidencialidad, se realizará en formato interno; el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico y reevalúa el proceso de "llamado de variante" procediendo a la validación múltiple (caso debe ser validado por 3 médicos genetistas) y su posterior impresión.



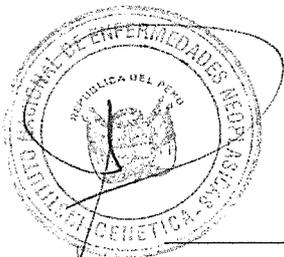
**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Forbes C, Fayter D, de Kock S, Quek RG. A systematic review of international guidelines and recommendations for the genetic screening, diagnosis, genetic counseling, and treatment of BRCA-mutated breast cancer. *Cancer Manag Res.* 2019; 11: 2321–37.
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004 Oct 21; 431 (7011):931–45.
3. Gabaldó Barrios X. Caracterización molecular y prevalencia de las variantes genéticas en BRCA1/2 en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario en la Región. *Proy Investig [Internet].* 2014 Nov 11.
4. Richards et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May; 17(5):405-24.



**XIII. ANEXO**

- Anexo N° 01. Control de cambios y mejoras.





PERÚ

Sector  
Salud

Instituto Nacional de  
Enfermedades Neoplásicas

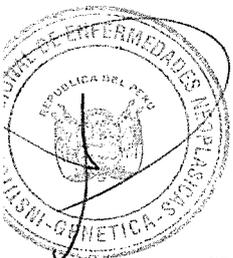
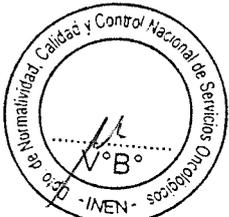


**PNT.DNCC. INEN. 031. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN PUNTUAL EN EL GEN BRCA1/2 POR SECUENCIAMIENTO V.01**

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

**ANEXO N° 01: 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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN. 032. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN ITD DEL GEN FLT3 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V.01**

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

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN ITD DEL GEN FLT3 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de mutación ITD del gen FLT3 por análisis de fragmentos.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

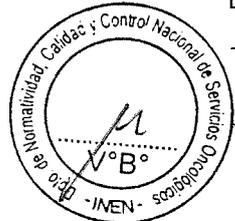
- Código CPMS (MINSA): 88299.22
- Código Tarifario INEN: 210765

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de detección de mutación ITD del gen FLT3 por análisis de fragmentos, en el Área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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:



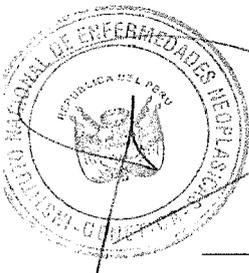
- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados en el SISINEN.

Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ADN, amplificación por PCR, análisis de fragmentos, 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.
- 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**

- 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 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.
- Ácido Nucleico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.



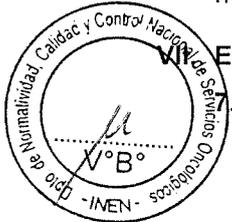
**PNT.DNCC. INEN. 032. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN ITD DEL GEN FLT3 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V.01**

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

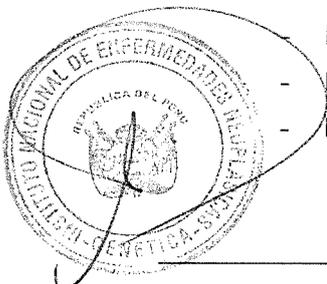
- Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de transmisión de genes y síntesis de proteínas.
- Análisis de Fragmentos: Análisis del tamaño y cantidad de fragmentos de DNA amplificados por PCR y marcados con fluorescencia.
- Estudio Molecular: Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- Muestra de Sangre Periférica: Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Punción de Médula Ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- 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.
- 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.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Prueba utilizada para gradación de riesgo (pronóstico) y manejo de leucemias agudas de estirpe mieloide en pacientes pediátricos y adultos; según guías actuales internacionales (1) así como el impacto de la carga alélica de la duplicación intratandem en el pronóstico y manejo (2).

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

- Analizador genético automatizado
- Balanza pequeña digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Cámara fotográfica digital
- Centrífuga para tubos
- Computadora
- Congeladora de metal, color plomo
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 18000 btu/H tipo mini split decorativo.
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 btu/H tipo piso techo.
- Espectrofotómetro
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Impresora de código de barras térmicas 102mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm



**PNT.DNCC. INEN. 032. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN ITD DEL GEN FLT3 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V.01**

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

- Lectora de código de barras
- Microcentrifuga
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Termociclador
- Transiluminador
- Vortex Genie 2 mixer, color blanco humo.

**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

**7.3 Mobiliario**

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

**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:****1° Actividad: Toma de muestra**

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrappo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL

**PNT.DNCC. INEN. 032. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN ITD DEL GEN FLT3 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V.01**

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

- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta

**2° Actividad: Registro de muestra**

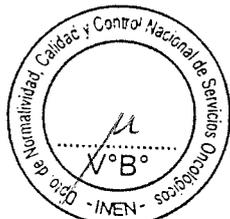
- lapicero de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

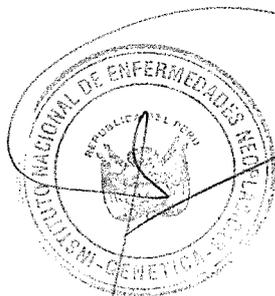
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.

**4° Actividad: Extracción de ADN y cuantificación**

- Alcohol etílico (Etanol) 98% x 2.5 L
- Alcohol isopropílico (Isopropanol) P.A. x 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit X 100 determinaciones.
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Tips con filtro 1000 UI X 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI X 96
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 mL X 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL X 500 U

**5° Actividad: Amplificación por PCR de región de interés**

- Agua para PCR x 5000 mL
- Deoxinucleótidos Dntps 4 X 40 Umol En Concentración 100 Mm (Kit)
- Enzima Taq ADN Polimerasa Termoactivable de Alta Fidelidad X 100 U
- Primer FLT3-14F1 FAM-5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' 50 N
- Primer FLT3-E15R 5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3' 50 N
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL X 96 U



**PNT.DNCC. INEN. 032. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN ITD DEL GEN FLT3 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V.01**

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 UI - 10 UI X 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI X 96 U

**6° Actividad: Preparación de gel**

- Estándar de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 A 600 Pb Marcados con fluorescencia X 800 determinaciones
- Formamida hidi desionizada ultrapura para secuenciamiento big dye X 25 MI
- Microplaca de polipropileno 96 pocillos para analizador genético abi 3500
- Polímero pop 7 para analizador genético 3500 sachet para 384 muestras
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL X 96 U
- Reactivo para condicionamiento analizador genético 3500
- Septa contenedor buffer catodo para analizador genético 3500 x 10 U
- Septa de placa para analizador genético 3500 de 96 pocillos x 20 U
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 X 4 U
- Solución tampón (buffer) catodo para analizador genético 3500 X 4 U
- Tips Estéril con Filtro 0.1 UI - 10 UI X 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI X 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500

**7° Actividad: Análisis de resultado****8° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. Obtención de la muestra:**

Procedimiento en 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. 032. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN ITD DEL GEN FLT3 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V.01**

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.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos Nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), Ácido Desoxirribonucleico complementario (cADN).

**10.3. Recipiente:**

- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula Ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

**10.4. 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 24 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2 – 8 °C.

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

Basado en metodología descrita previamente (3)(4) 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) por el personal asignado por encargo del procedimiento

**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:**

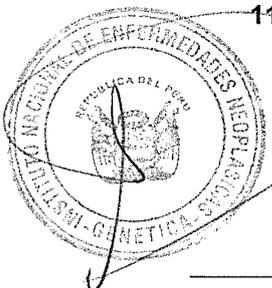
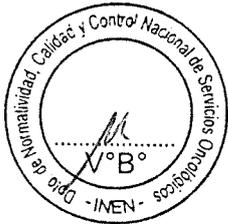
Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica.

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación:**

Se realiza a partir de 200 uL de sangre total por medio del kit de extracción de ADN genómico y el método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ADN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 600 ng/uL.

**11.5 Amplificación por PCR de región de interés:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para los exones 14 y 15 del gen FLT3 y por medio de uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima Taq Hot Start DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos



**PNT.DNCC. INEN. 032. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN ITD DEL GEN FLT3 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

de calor en el termociclador y se obtiene los productos amplificados de las regiones específicas.

**11.6 Análisis de fragmentos:**

Los productos de la amplificación son aforados con formamida y son llevados a una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, este debe contener la septa de placa y la septa de contenedor ánodo buffer con las soluciones tampón buffer ánodo y cátodo, así como los capilares deben contener el polímero pop 7 y los Estándares de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 a 600 pb marcados con fluorescencia; luego se da inicio a la electroforesis capilar según el programa específico para el análisis de fragmentos determinado.

**11.7 Análisis de resultado:**

Se realiza posterior a la corrida en el analizador genético del cual se exportan las secuencias genéticas en formato FASTA en el programa GeneMapper® y se realiza el análisis de los electroferogramas, considerando los controles de calidad para definir si la corrida es adecuada así como los estándares de tamaño de los fragmentos; en el caso de la mutación FLT3-ITD se comparan los picos del alelo salvaje (wild) que es de 318 pb y el alelo mutado (por encima de 393 pb), luego se procede a la obtención del ratio alélico entre el alelo wild y el alelo mutado según bibliografía (5)(6) y protocolos internos.

**11.8 Elaboración y entrega de resultado:**

El biólogo encargado de la prueba, elabora el resultado en el SISINEN; el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico, otros exámenes auxiliares y procede a la validación del caso en el SISINEN.

**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. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 26;129(4):424-47
3. Smith A, Nelson RJ. Capillary Electrophoresis of DNA. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2003;13(1):10.9.1-10.9.16
4. Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, Geiger T, Cooper LC, Smith BD, et al. Detection of FLT3 Internal Tandem Duplication and D835 Mutations by a Multiplex Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis Assay. *J Mol Diagn JMD*. 2003 May;5 (2):96-102.
5. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008 Mar 1; 111(5):2776-84.
6. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood*. 2013 Apr 4; 121(14):2734-8.

**XIII. ANEXO**

Anexo N° 01. Control de cambios y mejoras.

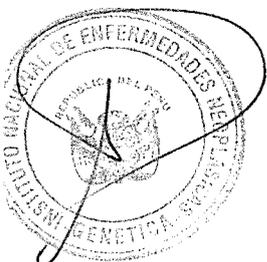
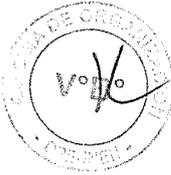


**PNT.DNCC. INEN. 032. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN ITD DEL GEN FLT3 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V.01**

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

**ANEXO N° 01: 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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN. 033. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIÓN A DEL GEN NPM1 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN A DEL  
GEN NPM1 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de mutación A del gen NPM1 por análisis de fragmentos.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.21
- Código Tarifario INEN: 210766

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección de mutación A del gen NPM1 por Análisis de Fragmentos por análisis de fragmentos, en el Área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ADN, amplificación por PCR, análisis de fragmentos, 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.
- 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**

- 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 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.
- Ácido Nucléico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado nucleótido.

**PNT.DNCC. INEN. 033. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIÓN A DEL GEN NPM1 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- Análisis de Fragmentos: análisis del tamaño y cantidad de fragmentos de DNA amplificados por PCR y marcados con fluorescencia.
- 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.
- Muestra de Sangre Periférica: Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Punción de Médula Ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- 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.
- 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.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Prueba utilizada para diagnóstico y gradación de riesgo (pronóstico) de leucemias agudas de estirpe mieloide en pacientes pediátricos y adultos; según guías actuales internacionales (1) y el impacto en pronóstico y manejo (2).

**VII. EQUIPAMIENTO****1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático). –**

- Analizador genético automatizado
- Balanza pequeña digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Cámara fotográfica digital
- Centrifuga para tubos
- Computadora
- Congeladora de metal, color plomo
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 18 000 btu/H tipo mini split decorativo.
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24 000 btu/H tipo piso techo.
- Espectrofotómetro
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras

**PNT.DNCC. INEN. 033. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIÓN A DEL GEN NPM1 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Microcentrifuga
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Termociclador
- Transiluminador
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.

**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

**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

**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:****1° Actividad: Toma de muestra**

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrupo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato

**PNT.DNCC. INEN. 033. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN A DEL GEN NPM1 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA

**2° Actividad: Registro de muestra**

- Lapicero de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

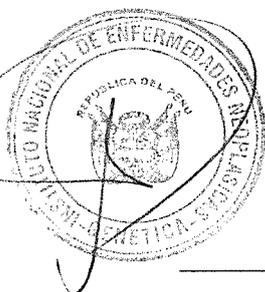
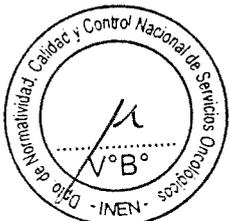
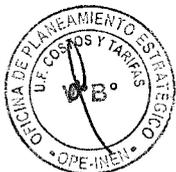
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.

**4° Actividad: Extracción de ADN y cuantificación**

- Alcohol etílico (Etanol) 98% X 2.5 L
- Alcohol isopropílico (Isopropanol) P.A. x 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit X 100 determinaciones.
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Tips con filtro 1000 UI X 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI X 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL X 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500 U

**5° Actividad: Amplificación por PCR de región de interés**

- Agua para PCR x 500 mL
- Deoxinucleótidos Dntps 4 X 40 Umol En Concentración 100 Mm (Kit)
- Enzima Taq Hot Start DNA Polimerasa (5U/UI) X 1000 U
- PRIMER NPM1-An 5'-CAAGAGGCTATTCAAGATCTCTGTCTG-3' 50 N
- PRIMER NPM1-F 5'-FAM-ACTCTCTGGTGGTAGAATGAA-3' X 50 nmol
- Puntera (Tips) Estéril con Filtro 2 uL - 20 uL X 96 U
- Tips Estéril con Filtro 0.1 UI - 10 UI X 96 U



**PNT.DNCC. INEN. 033. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN A DEL GEN NPM1 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tips Estéril con Filtro 20 UI - 200 UI X 96 U

**6° Actividad: Análisis de fragmentos**

- Estándar de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 a 600 Pb marcados con fluorescencia X 800 determinaciones
- Formamida hidi desionizada ultrapura para secuenciamiento big dye X 25 mL
- Microplaca de olipropileno 96 pocillos para analizador genético abi 3500
- Polímero pop 7 para analizador genético 3500 sachet para 384 muestras
- Puntera (Tips) estéril con filtro 10 uL - 100 uL X 96 U
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL X 96 U
- Reactivo para condicionamiento analizador genético 3500
- Septa contenedor buffer catodo para analizador genético 3500 X 10 U
- Septa de placa para analizador genético 3500 de 96 pocillos x 20 U
- Solución tampón (Buffer) ánodo para analizador genético 3500 X 4 U
- Solución tampón (Buffer) cátodo para analizador genético 3500 X 4 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI X 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500

**7° Actividad: Análisis de resultado****8° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro.

**SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de equipamiento:

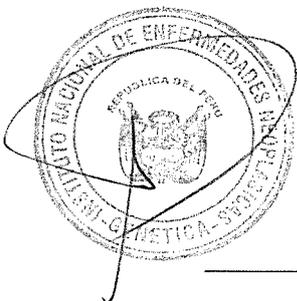
- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. Obtención de la muestra:**

- Sangre Venosa: se realiza por el personal asignado según encargado del procedimiento en el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula Ósea: se realiza por el personal asignado según encargado del procedimiento en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina



**PNT.DNCC. INEN. 033. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN A DEL GEN NPM1 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y por el personal asignado según encargado del procedimiento en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos Nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), Ácido Desoxirribonucleico complementario (cADN).
- Médula Ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

**10.3. Recipiente:**

- Sangre venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula Ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

**10.4. 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 24 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2 – 8 °C.

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

Basado en metodología descrita previamente (3) (4) 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 por el personal del Área de Trabajo Toma Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica).

**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.

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación:**

Se realiza a partir de 200 uL de sangre total por medio del kit de extracción de ADN genómico y el método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ADN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 600 ng/ uL.

**11.5 Amplificación por PCR de región de interés:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para el exón 12 del gen NPM1 y por medio de uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima Taq Hot Start DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos

**PNT.DNCC. INEN. 033. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIÓN A DEL GEN NPM1 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

de calor en el termociclador y se obtiene los productos amplificados de las regiones específicas.

**11.6 Análisis de fragmentos:**

Los productos de la amplificación son aforados con formamida y son llevados a una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, este debe contener la septa de placa y la septa de contenedor ánodo buffer con las soluciones tampón buffer ánodo y cátodo, así como los capilares deben contener el Polímero Pop 7 y los estándares de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 pb a 600 pb marcados con fluorescencia; luego se da inicio a la electroforesis capilar según el programa específico para el análisis de fragmentos determinado.

**11.7 Análisis de resultado:**

Se realiza posterior a la corrida en el analizador genético del cual se exportan las secuencias genéticas en formato FASTA en el programa GeneMapper® y se realiza el análisis de los electroferogramas, considerando los controles de calidad para definir si la corrida es adecuada así como los estándares de tamaño de los fragmentos; en el caso de la mutación A en el gen NPM1FLT3-ITD se comparan los picos del alelo salvaje (wild) que es de 169 pb y el alelo mutado de 173 pb (en casos raros se considerará 174 pb) según bibliografía (5) y protocolos internos.

**11.8 Elaboración y entrega de resultado:**

El biólogo encargado de la prueba, elabora el resultado en el SISINEN; el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico, otros exámenes auxiliares y procede a la validación del caso 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. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 26;129(4):424-47
3. Smith A, Nelson RJ. Capillary Electrophoresis of DNA. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2003;13(1):10.9.1-10.9.16
4. Szankasi P, Jama M, Bahler DW. A New DNA-Based Test for Detection of Nucleophosmin Exon 12 Mutations by Capillary Electrophoresis. *J Mol Diagn JMD*. 2008 May;10(3):236-41
5. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008 Mar 1; 111(5):2776-84.

**XIII. ANEXO**

- Anexo N° 01. Control de cambios y mejoras.

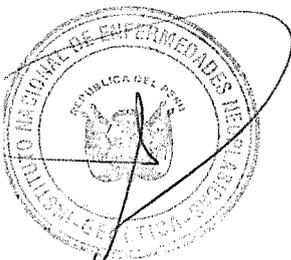


**PNT.DNCC. INEN. 033. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN A DEL GEN NPM1 POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS V. 01**

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

**ANEXO N° 01: 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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN. 034. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS B, V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS B****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Análisis de clonalidad para linfomas de células B.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81261
- Código Tarifario INEN: 210752

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Análisis de Clonalidad para Linfomas de células B, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ADN, amplificación por PCR, análisis de fragmentos, 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.
- 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.
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina.

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- 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 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.

**PNT.DNCC. INEN. 034. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS B, V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Ácido Nucleico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- Análisis de Fragmentos: Análisis del tamaño y cantidad de fragmentos de DNA amplificados por PCR y marcados con fluorescencia.
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido fresco.
- 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.
- Muestra de Sangre Periférica: Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Punción de Médula Ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- 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.
- 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.
- Tejido Parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.

**SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Prueba utilizada como apoyo al diagnóstico para la determinación de clonalidad en casos de sospecha de proliferación clonal linfocito B, por medio de identificación de reordenamientos clonales de genes de la cadena pesada de la inmunoglobulina de superficie del linfocito B, por lo tanto, apoya en el diagnóstico (1).

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

- Analizador genético automatizado
- Balanza digital pequeña
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Cámara fotográfica digital
- Centrifuga para tubos
- Computadora
- Congeladora de metal, color plomo
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24 000 btu/H tipo mini split decorativo

**PNT.DNCC. INEN. 034. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS B, V.01**

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

- Espectrofotómetro
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrifuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Teclado keyboard con puerto USB
- Termociclador
- Transiluminador
- Unidad Central de Proceso-CPU de 3.1GHz
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo

**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

**7.3 Mobiliario**

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

**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material****1° Actividad - toma de muestra**

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste

**PNT.DNCC. INEN. 034. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS B, V.01**

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

- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo de plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA

**2° Actividad - registro de muestra**

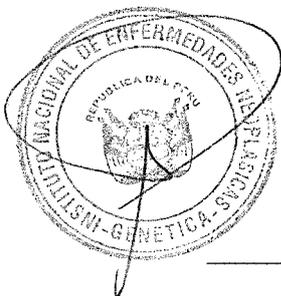
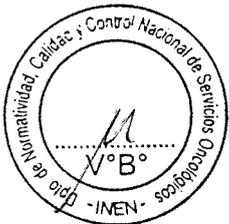
- Lapicero de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox código ref. 106r02318 negro

**3° Actividad - procesamiento de muestra**

- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Cuchilla descartable de perfil alto para microtomo de rotación x 50
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aproximadamente

**4° Actividad - extracción de ADN y cuantificación**

- Alcohol etílico (Etanol) 98% X 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit X 100 determinaciones
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado x 50 reacciones
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U



**PNT.DNCC. INEN. 034. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS B, V.01**

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

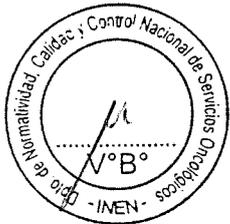
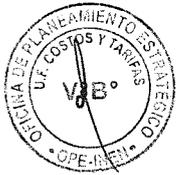
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000. U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500. U
- Xilol Q.P. x 4 L

**5° Actividad - amplificación por PCR**

- Kit de análisis de fragmentos para detección de clonalidad de linfomas de células B x 33 determinaciones.
- Enzima taq gold polimerasa x 250 unidades.
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 uL con tapa x 1000 U
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U

**6° Actividad - análisis de fragmentos**

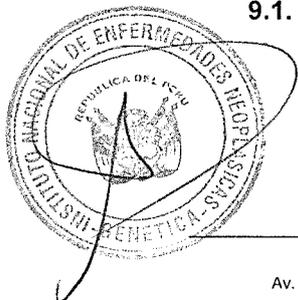
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético Abi 3500
- Estándar de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 A 600 Pb M marcados con fluorescencia x 800 determinaciones.
- Formamida hidi desionizada ultrapura para secuenciamiento big dye x 25 mL
- Microplaca de polipropileno 96 pocillos para analizador genético abi 3500
- Polímero pop 7 para analizador genético 3500 sachet para 384 muestras
- Puntera (tips) estéril con filtro 10 uL - 100 uL x 96 U
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Reactivo para condicionamiento analizador genético 3500
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 U
- Septa de placa para analizador genético 3500 de 96 Pocillos x 20 U
- Solución tampón (Buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 U
- Solución tampón (Buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U

**7° Actividad - análisis de resultado****8° Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox código ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos**

- Mantenimiento preventivo de Equipamiento:
- Equipos Biomédicos



**PNT.DNCC. INEN. 034. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS B, V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. Obtención de la muestra**

- Sangre venosa: se realiza por el personal asignado por encargo del responsable del procedimiento, en el área de trabajo de Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza por personal del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y por personal del Equipo Funcional del Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.
- Tejido embebido en parafina: se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**10.2. Sistema biológico**

- Ácidos nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN).
- Médula ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Bloque de tejido embebido en parafina.

**10.3. Recipiente**

- Sangre venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Bloque de tejido embebido en parafina (TEEP).

**10.4. 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 24 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2 - 8 °C en el caso de sangre periférica y médula ósea; los bloques de tejido embebido en parafina deberán ser almacenados a temperatura ambiente.

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

Basado en metodología descrita por van Dongen (BIOMED2) (2) y modificaciones propias 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

**PNT.DNCC. INEN. 034. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS B, V.01**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).

Tejido embebido en parafina (TEEP): se obtiene del área de Patología Quirúrgica.

**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**

Sangre periférica/médula ósea: 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.

Tejido embebido en parafina (TEEP): posterior a la marcación de lámina y elección del bloque de parafina, se realizan cortes en micrótopo (5 cortes, 5 micras cada uno).

**11.4 Extracción de ADN**

Sangre periférica/médula ósea: Se realiza a partir de 200 uL de sangre total por medio del kit de extracción de ADN genómico y el método de columnas: Centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer.

TEEP: Por medio del kit de extracción de ácidos nucleicos a partir de muestra incluida en parafina y por metodología de centrifugación, lavados y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con 70 uL de buffer de elución.

Cuantificación: La cantidad de ácido nucleico (ADN) se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100 ng/uL.

**11.5 Amplificación por PCR**

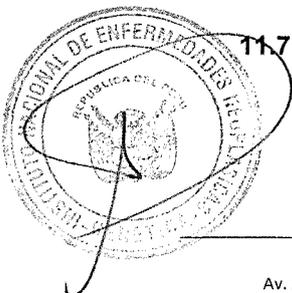
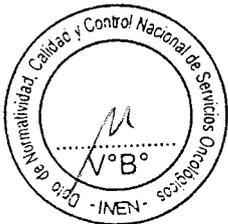
Se prepara el proceso de PCR por duplicado, con los componentes del kit de análisis de fragmentos para detección de clonalidad de linfomas de células B y por medio de uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima Taq Gold polimerasa). El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene los productos amplificados de las regiones específicas (6 regiones del gen IGH).

**11.6 Análisis de fragmentos**

Los productos de la amplificación son aforados con formamida y son llevados a una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, este debe contener la septa de placa y la septa de contenedor ánodo buffer con las soluciones tampón buffer ánodo y cátodo, así como los capilares deben contener el polímero Pop 7 y los estándares de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 pb. a 600 pb. marcados con fluorescencia; luego se da inicio a la electroforesis capilar según el programa IGH CLONALITY para el análisis de fragmentos determinado.

**11.7 Análisis de resultado**

Se realiza posterior a la corrida en el analizador genético del cual se exportan las secuencias genéticas en formato FASTA en el programa GeneMapper® y se realiza





**PNT.DNCC. INEN. 034. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS B, V.01**

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

el análisis de los electroferogramas según el análisis IGH fragmentos, considerando los controles de calidad para definir si la corrida es adecuada así como los estándares de tamaño de los fragmentos; se debe buscar que los 6 fragmentos amplificados estén por encima de los 300 pb, luego se valoran los estados de policlonalidad/seudoclonalidad/monoclonalidad según bibliografía (3) y protocolos internos.

**11.8 Elaboración y entrega de resultado**

El biólogo encargado de la prueba, elabora el resultado en el SISINEN; el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico, otros exámenes auxiliares y procede a la validación del caso en el SISINEN.



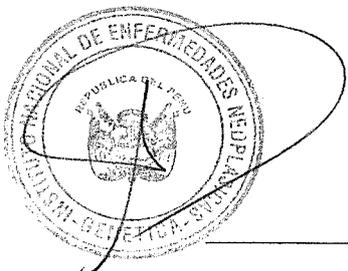
**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375–90
2. Van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans P a. S, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2257–317
3. Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012 Oct; 26(10):2159–71



**XIII. ANEXOS**

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





PERÚ

Sector Salud

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

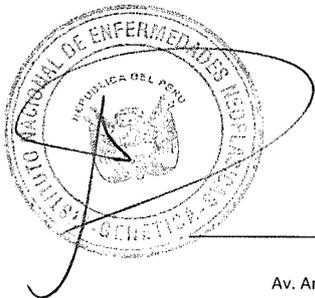
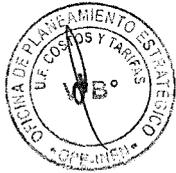
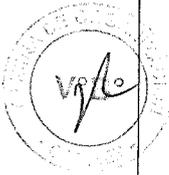


### PNT.DNCC. INEN. 034. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS B, V.01

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

#### ANEXO N° 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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN. 035. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS T V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS T****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Análisis de clonalidad para Linfomas de células T.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSa): 88299.29
- Código Tarifario INEN: 21075†

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Análisis de Clonalidad para Linfomas de células T, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ADN, amplificación por PCR, análisis de fragmentos, 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.
- 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.
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina.

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- 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 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.

**PNT.DNCC. INEN. 035. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS T V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Ácido Nucléico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de transmisión de genes y síntesis de proteínas.
- Análisis de Fragmentos: Análisis del tamaño y cantidad de fragmentos de DNA amplificados por PCR y marcados con fluorescencia.
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido fresco.
- 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.
- Muestra de Sangre Periférica: Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Punción de Médula Ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- 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.
- 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.
- Tejido Parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.

**SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Prueba utilizada como apoyo al diagnóstico para la determinación de clonalidad en casos de sospecha de proliferación clonal linfóide T, por medio de identificación de reordenamientos clonales de genes codificantes para la cadena beta y gamma del gen TCR, por lo tanto, apoya en el diagnóstico (1).

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

- Analizador genético automatizado
- Balanza pequeña digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Cámara fotográfica digital
- Centrífuga para tubos
- Computadora
- Congeladora de metal, color plomo
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 btu/H tipo mini split decorativo.

**PNT.DNCC. INEN. 035. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS T V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Espectrofotómetro
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrífuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Termociclador
- Transiluminador
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.

**7.2 Instrumentales**

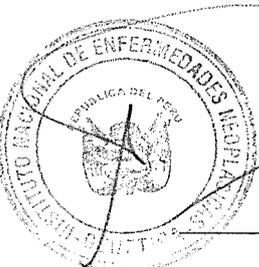
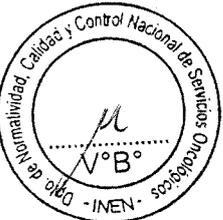
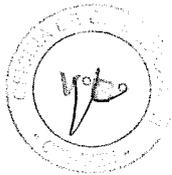
- Micropipeta volumen variable 0.5 uL - 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL - 200 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL - 1000 uL

**7.3 Mobiliario**

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

**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:****1° Actividad: Toma de muestra**

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m



**PNT.DNCC. INEN. 035. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS T V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con EDTA

**2° Actividad: Registro de muestra**

- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Cuchilla descartable de Perfil Alto para microtomo de rotación x 50
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.

**4° Actividad: Extracción de ADN**

- Alcohol etílico (Etanol) 98% x 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado x 50 reacciones
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 mL x 1000 U

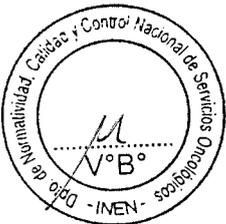


**PNT.DNCC. INEN. 035. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS T V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U
- Xilol Q.P. x 4 L

**5° Actividad: Amplificación por PCR**

- Enzima taq gold polimerasa x 250 U
- Kit de análisis de fragmentos para detección de clonalidad de linfomas de células T x 33 determinaciones
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL – 20 uL x 96 U
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Tubo de Polipropileno para PCR de 200 uL con tapa x 1000 U

**6° Actividad: Análisis de fragmentos**

- Arreglo de 8 capilares para analizador genético Abi 3500
- Estándar de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 Pb a 600 Pb marcados con fluorescencia x 800 determinaciones
- Formamida hidi desionizada ultrapura para secuenciamiento big dye x 25 mL
- Microplaca de polipropileno 96 pocillos para analizador genético abi 3500
- Polímero pop 7 para analizador genético 3500 sachet para 384 muestras
- Puntera (Tips) estéril con filtro 10 uL - 100 uL x 96 U
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Reactivo para condicionamiento analizador genético 3500
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 U
- Septa de placa para analizador genético 3500 de 96 pocillos x 20 U
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 U
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U

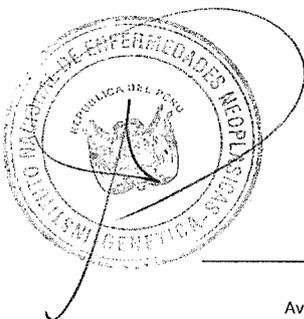
**7° Actividad: Análisis de resultado****8° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado



**PNT.DNCC. INEN. 035. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS T V.01**

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

- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. 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.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos Nucléicos: Ácido Ribonucleico (ARN), Ácido Desoxirribonucleico complementario (cADN).

**10.3. Recipiente:**

- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula Ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Bloque de tejido embebido en parafina.

**10.4. 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 24 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2 – 8 °C en el caso de sangre periférica

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

Basado en metodología descrita por Van Dongen (BIOMED2) (2) y modificaciones propias del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

**11.1 Toma de muestra:**

Realizada por el personal del Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica) o por el Médico Oncólogo del 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). El tejido parafino embebido en parafina se obtendrá de los archivos del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**PNT.DNCC. INEN. 035. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS T V.01**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:**

Sangre periférica/médula ósea: 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.

Tejido parafino embebido en parafina (TEEP): posterior a la marcación de lámina y elección del bloque de parafina, se realizan cortes en micrótopo (5 cortes, 5 micras cada uno).

**11.4 Extracción de ADN:**

Sangre periférica/médula ósea: se realiza a partir de 200 uL de sangre total por medio del kit de extracción de ADN genómico y el método de columnas: Centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer.

TEEP: por medio del kit de extracción de Ácidos Nucleicos a partir de muestra incluida en parafina y por metodología de centrifugación, lavados y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con 70 uL de buffer de elución

Cuantificación: la cantidad de ácido nucleico (ADN) se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100 ng/uL.

**11.5 Amplificación por PCR:**

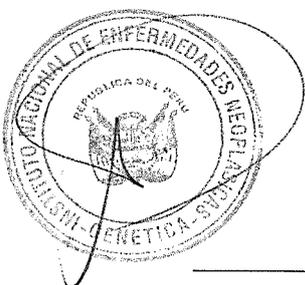
Se prepara el proceso de PCR por duplicado, con los componentes del kit de análisis de fragmentos para detección de clonalidad de linfomas de células T y por medio de uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima Taq Gold polimerasa). El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene los productos amplificados de las regiones específicas.

**11.6 Análisis de fragmentos:**

Los productos de la amplificación son aforados con formamida y son llevados a una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, este debe contener la septa de placa y la septa de contenedor ánodo buffer con las soluciones tampón buffer ánodo y cátodo, así como los capilares deben contener el polímero pop 7 y los estándares de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 pb a 600 pb marcados con fluorescencia; luego se da inicio a la electroforesis capilar según el programa TCR CLONALITY para el análisis de fragmentos determinado.

**11.7 Análisis de resultado:**

Se realiza posterior a la corrida en el analizador genético del cual se exportan las secuencias genéticas en formato FASTA en el programa GeneMapper® y se realiza el análisis de los electroferogramas según el análisis de los fragmentos TCR, considerando los controles de calidad para definir si la corrida es adecuada, así como los estándares de tamaño de los fragmentos; se debe buscar que los fragmentos amplificados estén por encima de los 300 pb, luego se valoran los estados de policlonalidad/seudoclonalidad/monoclonalidad según bibliografía(3) y protocolos internos.





# PNT.DNCC. INEN. 035. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS T V.01

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:

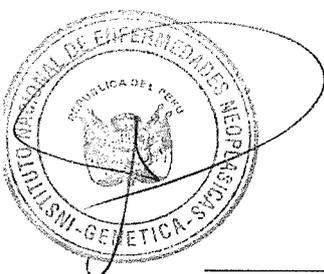
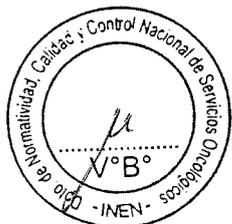
El biólogo encargado de la prueba, elabora el resultado en el SISINEN; el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico, otros exámenes auxiliares y procede a la validación del caso en el SISINEN.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 2016 May 19; 127(20):2375–90.
2. Van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans P a. S, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia. 2003 Dec; 17(12):2257–317.
3. Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. Leukemia. 2012 Oct;26(10):2159–71.

## XIII. ANEXO

- Anexo N° 01: Control de cambios y mejoras.





PERÚ

Sector  
Salud

Instituto Nacional de  
Enfermedades Neoplásicas

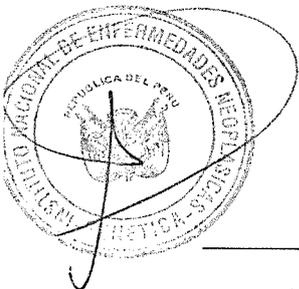
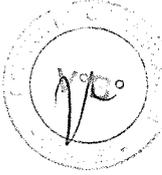


**PNT.DNCC. INEN. 035. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE CLONALIDAD PARA LINFOMA DE CÉLULAS T V.01**

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

**ANEXO N° 01: 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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez





**PNT.DNCC. INEN.036. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD 1p/19q PCR MÚLTIPLE V.01**

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

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD 1p/19q PCR MÚLTIPLE**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Determinación de la pérdida de heterocigosidad 1p/19q PCR múltiple.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.32
- Código Tarifario INEN: 210754

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Determinación de la pérdida de heterocigosidad 1p/19q PCR múltiple, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

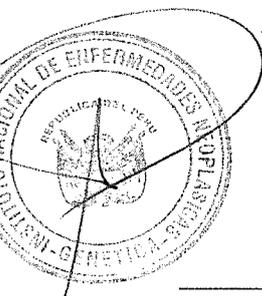
**IV. RESPONSABILIDADES**

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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ADN, amplificación por PCR, análisis de fragmentos, 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.
- 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 Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina.

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- 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 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.





**PNT.DNCC. INEN.036. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD 1p/19q PCR MÚLTIPLE  
V.01**

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

- Ácido Nucleico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de transmisión de genes y síntesis de proteínas.
- Análisis de Fragmentos: Análisis del tamaño y cantidad de fragmentos de DNA amplificados por PCR y marcados con fluorescencia.
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido fresco.
- 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.
- Muestra de Sangre Periférica: Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Punción de Médula Ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- 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.
- 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.
- Tejido Parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.

### SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Prueba utilizada para determinar la pérdida de Heterocigosidad (LOH) por medio del análisis molecular de regiones del brazo corto del cromosoma 1 (1p) y el brazo largo del cromosoma 19 (19q) mediante la comparación de los perfiles alélicos de tejido normal (sangre periférica) y tejido tumoral. Es útil como marcador diagnóstico en todos aquellos casos en los que hay sospecha de tumores de línea glial (oligodendroglioma u otros gliomas malignos) y ayudar a diferenciar éstas de otras neoplasias morfológicamente parecidas. Tiene papel pronóstico y permitirá guiar el tratamiento de quimioterapia de primera línea y predecir una mayor supervivencia de los pacientes (1).

### VII. EQUIPAMIENTO

#### 7.1 Equipamiento (médico, biomédico, electromecánico, informático)

- Analizador genético automatizado
- Balanza pequeña digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Cámara fotográfica digital
- Centrifuga para tubos
- Computadora
- Congeladora de metal, color plomo

**PNT.DNCC. INEN.036. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD 1p/19q PCR MÚLTIPLE V.01**

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

- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 btu/H tipo piso techo.
- Espectrofotómetro
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Impresora de código de barras térmicas 102mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrifuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Termociclador
- Transiluminador
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.

### 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

### 7.3 Mobiliario

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

## VIII. SUMINISTROS

### 8.1 Insumos y material:

#### 1° Actividad: Toma de muestra

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste



**PNT.DNCC. INEN.036. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD 1p/19q PCR MÚLTIPLE  
V.01**

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

- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA



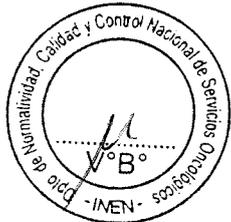
**2° Actividad: Registro de muestra**

- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro



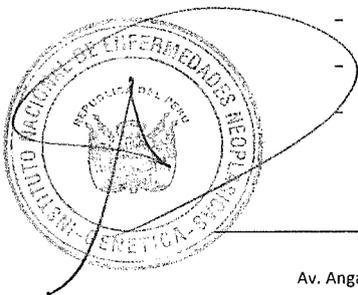
**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Cuchilla descartable de perfil alto para microtomo de rotación x 50
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.



**4° Actividad: Extracción de ADN**

- Alcohol Etilico (Etanol) 98% x 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado x 50 reacciones
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U





**PNT.DNCC. INEN.036. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD 1p/19q PCR MÚLTIPLE V.01**

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

- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U
- Xilol Q.P. x 4 L

**5° Actividad: Amplificación por PCR**

- Primer Marcado D1S162 F: 5' Ned - Gggggaagaagtcgagtag - 3' x 1000 Determinaciones.
- Primer Marcado D1S199 F: 5' Fam - Ggtgacagagtgagaccctg - 3' x 1000 Determinaciones.
- Primer Marcado D1S226 F: 5' Hex - Gctagtcaggcatgagcg - 3' x 1000 Determinaciones.
- Primer Marcado D1S186 F: 5' Ned - Tagtcatcccccttct - 3' x 1000 Determinaciones.
- Primer Marcado D1S312 F: 5' Fam - Cagcctccccacaacttta - 3' x 1000 Determinaciones.
- Primer Marcado D19S918 F: 5' Fam - Aaaggcttgattacccoga - 3' x 1000 Determinaciones.
- Primer Marcado D19S206 F: 5' Hex - Ttcatcaagtctgtccagcc- 3' x 1000 Determinaciones.
- Primer Marcado D19S112 F: 5' Hex - Gccagccattcagtcattgaag - 3' x 1000 Determinaciones.
- Enzima Taq Gold Polimerasa x 250 U
- Tips Estéril con Filtro 0.1 UI - 10 UI X 96 U
- Tips Estéril con Filtro 20 UI - 200 UI X 96 U
- Tubo de Polipropileno para PCR de 200 uL con tapa X 1000
- Puntera (Tips) Estéril con Filtro 2 uL - 20 uL X 96Formamida Hidi Desionizada Ultrapura

**6° Actividad: Análisis de fragmentos**

- Arreglo de 8 capilares para analizador genético Abi 3500
- Estándar de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 A 600 Pb marcados con fluorescencia x 800 determinaciones
- Formamida hidi desionizada ultrapura para secuenciamiento big dye x 25 mL
- Microplaca de polipropileno 96 pocillos para analizador genético abi 3500
- Polímero pop 7 para analizador genético 3500 sachet para 384 muestras
- Puntera (tips) estéril con filtro 10 uL - 100 uL x 96 U
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Reactivo para condicionamiento analizador genético 3500
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 U
- Septa de placa para analizador genético 3500 de 96 Pocillos x 20 U
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 U



**PNT.DNCC. INEN.036. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE HETEROLOGICIDAD 1p/19q PCR MÚLTIPLE V.01**

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

- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500 U

**7° Actividad: Análisis de resultado**

**8° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS**

**9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA**

**10.1. 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.
- Tejido embebido en parafina: se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos Nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), Ácido Desoxirribonucleico complementario (cADN).

**10.3. Recipiente:**

- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Bloque de tejido embebido en parafina.

**10.4. 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 24 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2 – 8 °C en el caso de sangre periférica; los bloques de tejido embebido en parafina deberán ser almacenados a temperatura ambiente.



**PNT.DNCC. INEN.036. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD 1p/19q PCR MÚLTIPLE V.01**

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

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

Basado en metodología descrita por Hatanpaa et al. (2) y modificaciones propias del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

**11.1 Toma de muestra:**

Realizada por el personal del Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica).

**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:**

Sangre periférica: 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.

TEEP: posterior a la marcación de lámina y elección del bloque de parafina, se realizan cortes en micrótopo (5 cortes, 5 micras cada uno).

**11.4 Extracción de ADN:**

Sangre periférica: se realiza a partir de 200 uL de sangre total por medio del kit de extracción de ADN genómico y el método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer.

TEEP: se realiza la desparafinación por medio de batería de alcoholes: xilol y etanol; en posterior por medio del kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado y método de extracción de columnas: centrifugación y extracción del sobrenadante se obtendrá un pellet de ácido nucleico (ADN)

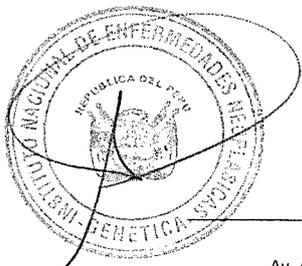
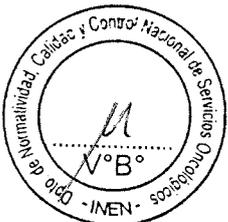
Cuantificación: la cantidad de ácido nucleico (ADN) se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100 ng/uL.

**11.5 Amplificación por PCR:**

Se prepara el proceso de PCR por medio de los primers específicos para 10 marcadores del brazo corto del cromosoma 1 (1p) y 6 marcadores a nivel del brazo largo del cromosoma 19 (19q) y por medio de uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima Taq Gold polimerasa). 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.

**11.6 Análisis de fragmentos:**

Los productos de la amplificación son aforados con formamida y son llevados a una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, este debe contener la septa de placa y la septa de contenedor ánodo buffer con las soluciones tampón buffer ánodo y cátodo, así como los capilares deben contener el polímero pop 7 y los estándares de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 a 600pb marcados con fluorescencia; luego se da inicio a la electroforesis capilar según el programa específico para el análisis de fragmentos determinado.





**PNT.DNCC. INEN.036. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD 1p/19q PCR MÚLTIPLE V.01**

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

**11.7 Análisis de resultado:**

Se realiza posterior a la corrida en el analizador genético del cual se exportan las secuencias genéticas en formato FASTA en el programa GeneMapper® y se realiza el análisis de los electroferogramas según el análisis específico, considerando los controles de calidad para definir si la corrida es adecuada así como los estándares de tamaño de los fragmentos; se comparan los patrones tanto a nivel tumoral como a nivel constitutivo (sangre) y se valoran los estados de pérdida de heterocigosidad según bibliografía (2) y protocolos internos.

**11.8 Elaboración y entrega de resultado:**

El biólogo encargado de la prueba, elabora el resultado en el SISINEN; el médico genetista a cargo revisa la corrida, evalúa el caso clínico, otros exámenes auxiliares y procede a la validación del caso en el SISINEN.



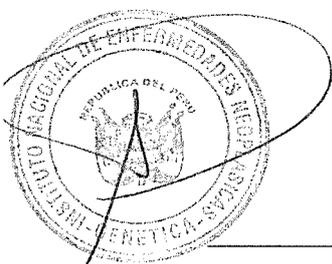
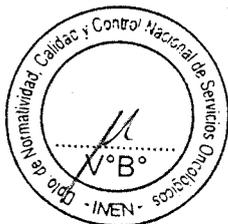
**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol (Berl). 2016 Jun;131(6):803–20.
2. Hatanpaa KJ, Burger PC, Eshleman JR, Murphy KM, Berg KD. Molecular diagnosis of oligodendroglioma in paraffin sections. Lab Invest J Tech Methods Pathol. 2003 Mar;83 (3):419–28.



**XIII. ANEXO**

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



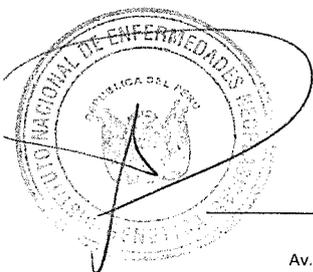


PNT.DNCC. INEN.036. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD 1p/19q PCR MÚLTIPLE V.01

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

ANEXO N° 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

Table with 5 columns: VERSIÓN, PÁGINA, DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA, FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN), and AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN). Row 1: 01, 1-9, Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC...

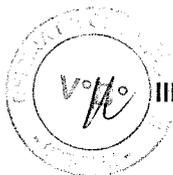


**PNT.DNCC. INEN.037. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PCR  
CUANTITATIVO CITOMEGALOVIRUS V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PCR CUANTITATIVO  
CITOMEGALOVIRUS****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de PCR Cuantitativo Citomegalovirus.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 86644.01.
- Código Tarifario INEN: 210729.

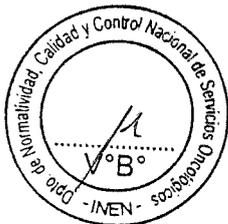
**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de PCR cuantitativo citomegalovirus, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

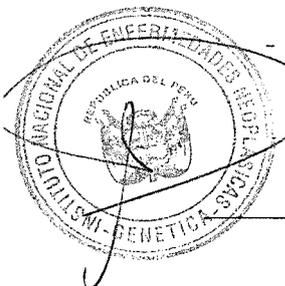
**IV. RESPONSABILIDADES**

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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción de ácidos nucleicos, amplificación, 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.
- 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/cirujano de los Departamentos de Oncología Médica/Pediátrica y Departamentos de la Dirección de Cirugía: se encargan de la toma de muestra de médula ósea, tejido fresco por medio de biopsias u obtención de líquidos orgánicos (líquido cefalorraquídeo, orina u otros líquidos orgánicos).
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina.

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- 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.
- Ácido Nucléico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.



**PNT.DNCC. INEN.037. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PCR  
CUANTITATIVO CITOMEGALOVIRUS V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- ADN Viral: Sigla de ácido desoxirribonucleico, proteínas complejas que se encuentran en el núcleo de las células y constituye el principal constituyente del material genético de los virus.
- ARN Viral: Sigla de ácido ribonucleico, ácido nucleico que participa en la síntesis de las proteínas y realiza la función de mensajero de la información genética en virus.
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido fresco.
- 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.
- Líquido Orgánico: Es esencial para el medio interno y externo de las células sanas. Contiene agua y sustancias disueltas como electrolitos. Cualquier cambio en este puede afectar la función celular.
- Muestra de Sangre Periférica: Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Pellet: Pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Plasma: Parte líquida de la sangre, linfa, líquido intersticial y cefalorraquídeo desprovisto de células, está formado por agua, proteínas, glúcidos y lípidos mayoritariamente.
- Punción de Médula Ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica que consiste en la amplificación IN VITRO de un fragmento de ADN/ cDNA específico.
- 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.
- Tejido Fresco: Sección de tejido tomado por un proceso de biopsia, no parafinado.
- Tejido Parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de determinación de la carga viral de citomegalovirus en pacientes en pre y postransplante de precursores hematopoyéticos (autólogo y alogénico), en pacientes inmunosuprimidos, en control por infección previa por citomegalovirus y otros (1).

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

- Analizador genético automatizado
- Balanza pequeña digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Cámara fotográfica digital
- Centrífuga para tubos
- Computadora

**PNT.DNCC. INEN.037. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PCR  
CUANTITATIVO CITOMEGALOVIRUS V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Congeladora de metal, color plomo
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 btu/H tipo mini split decorativo.
- Espectrofotómetro
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrifuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Teclado keyboard con puerto USB
- Termociclador
- Transiluminador
- Unidad central de proceso-CPU de 3.1GHz
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.

**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

**7.3 Mobiliario**

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

**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:****1° Actividad: Toma de muestra**

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL

**PNT.DNCC. INEN.037. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PCR  
CUANTITATIVO CITOMEGALOVIRUS V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón drill unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con EDTA

**2° Actividad: Registro de muestra**

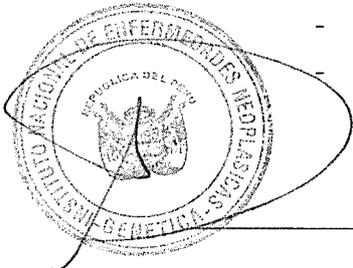
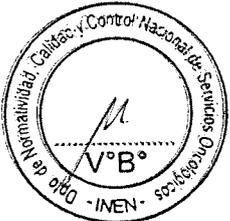
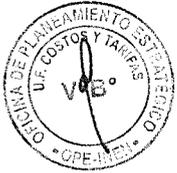
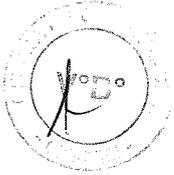
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.

**4° Actividad: Extracción de ácido nucleicos**

- Gorro descartable unisex x 100 U
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 mL



**PNT.DNCC. INEN.037. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PCR  
CUANTITATIVO CITOMEGALOVIRUS V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**5° Actividad: Amplificación**

- Kit lvd de PCR en tiempo real para detección y cuantificación viral de Cmv x 24 Determinaciones
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 mL x 1000 U

**6° Actividad: Análisis de resultado****7° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. 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.
- Líquidos orgánicos: 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.
- Tejido fresco: se realiza por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.
- Tejido embebido en parafino (TEEP): se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

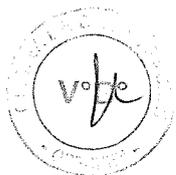
- Ácidos nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico viral.

**PNT.DNCC. INEN.037. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PCR  
CUANTITATIVO CITOMEGALOVIRUS V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**10.3. Recipiente:**

- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula Ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Líquidos Orgánicos: tubo estéril de 3cc.
- Tejido Fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000
- Tejido embebido en parafino (TEEP): bloque de parafina

**10.4. Conservación y manejo:**

- Sangre venosa/médula ósea: 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.
- Líquidos orgánicos: iniciar el proceso inmediatamente.
- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente.

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

Basado en metodología descrita por Dioverti MV et al. (2) y modificaciones propias del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

**11.1 Toma de muestra:**

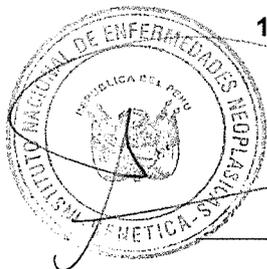
- Sangre venosa: realizada por el personal del Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica (sangre periférica).
- Médula ósea: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.
- Líquidos orgánicos: realizada por el Médico Oncólogo/Médico Cirujano del 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.
- Tejido fresco: realizado por el médico cirujano de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.
- Tejido embebido en parafino (TEEP): Obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**11.2 Registro de la muestra:**

Recepción de la 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:**

Sangre periférica/médula ósea: proceso preanalítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas la separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición



**PNT.DNCC. INEN.037. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PCR  
CUANTITATIVO CITOMEGALOVIRUS V. 01**

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

de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras, aquí se incluye el proceso de separación de plasma por medio de centrifugación por 10 min.

Líquidos orgánicos, tejido fresco: Sigue el mismo proceso preanalítico y pasan directamente a la siguiente actividad.

Tejido embebido en parafino (TEEP): posterior a la revisión por el patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina, se realizarán los pasos de desparafinación por medio de batería de alcoholes.

**11.4 Extracción de ácidos nucleicos:**

Plasma/ líquidos orgánicos: proceso realizado por el equipo extracción de ácidos nucleicos, se realiza por medio del método de columnas con los reactivos de extracción de ácidos nucleicos virales (incluidos en el KIT IVD de PCR), además de la preparación de los controles internos; al final de la corrida los productos obtenidos así como los controles internos son guardados a -20°C hasta la siguiente actividad.

TEEP: se realiza la desparafinación por medio de batería de alcoholes: xilol y etanol; en posterior por medio del kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado y método de extracción de columnas: centrifugación y extracción del sobrenadante se obtendrá un pellet de ácido nucleico viral.

Tejido fresco: se utiliza un tissue lisis buffer y proteinasa K, por medio de metodología de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá pellet de ácido nucleico viral.

**11.5 Amplificación:**

Se utilizan los reactivos del master (solución premezclada) incluido en el Kit PCR en tiempo real para detección y cuantificación viral de citomegalovirus (CMV) (IVD), los productos de esta reacción son pasados a viales sensibles a la luz para ser usados en el equipo de PCR en tiempo real, donde se irán evidenciando las curvas de amplificación durante el proceso de la corrida.

**11.6 Análisis de resultado:**

Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos virales y gen control; el resultado final se expresa en "copias/ml." por medio de fórmula definida para el proceso; este valor será transformado en escala logarítmica para poder ser correlacionados con los resultados previos (2).

**11.7 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. Taneja A, Chewning JH, Saad A. Viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY*. 2019;2(2):e43.
2. Dioverti MV, Lahr BD, Germer JJ, Yao JD, Gartner ML, Razonable RR. Comparison of Standardized Cytomegalovirus (CMV) Viral Load Thresholds in Whole Blood and Plasma of Solid Organ and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients with CMV Infection and Disease. *Open Forum Infect Dis*. 2017;4(3):ofx143.

**XIII. ANEXOS**

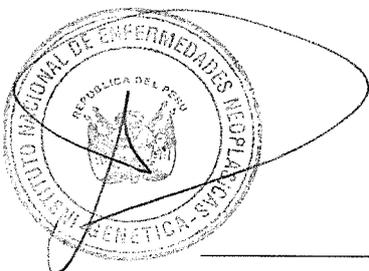
- Anexo N° 1: Control de cambios y mejoras.



**PNT.DNCC. INEN.037. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PCR CUANTITATIVO CITOMEGALOVIRUS V. 01**  
 Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
 Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

**ANEXO N° 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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN.038. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE EPSTEIN BARR VIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y  
CUANTIFICACIÓN VIRAL DE EPSTEIN BARR VIRUS****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección y cuantificación viral de Epstein Barr Virus.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.09
- Código Tarifario INEN: 210736

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección y cuantificación viral de Epstein Barr Virus, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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:

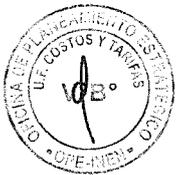
- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción de ácidos nucleicos, amplificación, 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.
- 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 del Departamento de Oncología Médica, médico oncólogo pediatra del Departamento de Oncología Pediátrica y Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía: se encargan de la toma de muestra de médula ósea, tejido fresco por medio de biopsias u obtención de líquidos orgánicos (líquido cefalorraquídeo, orina u otros líquidos orgánicos).
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.

**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.

**PNT.DNCC. INEN.038. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE EPSTEIN BARR VIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- 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.
- Líquido Orgánico: Es esencial para el medio interno y externo de las células sanas. Contiene agua y sustancias disueltas como electrolitos. Cualquier cambio en este puede afectar la función celular.
- Tejido Fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.
- Tejido Parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido fresco.
- 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.
- Plasma: Parte líquida de la sangre, linfa, líquido intersticial y cefalorraquídeo desprovisto de células, está formado por agua, proteínas, glúcidos y lípidos mayoritariamente.
- ARN Viral: Sigla de ácido ribonucleico, ácido nucleico que participa en la síntesis de las proteínas y realiza la función de mensajero de la información genética en virus.
- ADN Viral: Sigla de ácido desoxirribonucleico, proteínas complejas que se encuentra en el núcleo de las células y constituye el principal constituyente del material genético de los virus.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica de amplificación que consiste en la amplificación IN VITRO de un fragmento de ADN/ cDNA específico.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de determinación de la carga viral de Epstein Barr virus en pacientes en pre y postransplante de precursores hematopoyéticos (autólogo y alogénico), en pacientes inmunosuprimidos, en control por infección previa y otros (1).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos
- Vortex genie 2 Mixer, color blanco humo.
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Equipo para determinación de PCR en Tiempo Real.
- Equipo de extracción de ácidos nucleicos
- Purificador vertical de metal
- Microtomo de rotación



**PNT.DNCC. INEN.038. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE EPSTEIN BARR VIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Microcentrifuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Computadora
- Teclado alfanumérico
- CPU Intel Core i7-477
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmicas 102mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Monitor Plano de 20 In
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 btu/H tipo mini split decorativo.

**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

**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:****1° Actividad: Toma de muestra**

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacteriano para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S

**PNT.DNCC. INEN.038. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE EPSTEIN BARR VIRUS V.01**

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

- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con EDTA

**2° Actividad: Registro de muestra**

- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.

**4° Actividad: Extracción de Ácido Nucleicos**

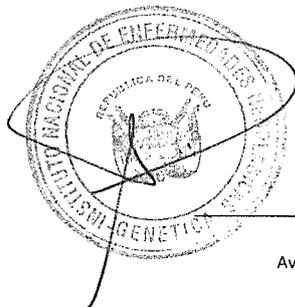
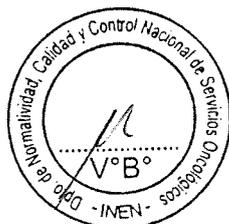
- Gorro Descartable Unisex x 100
- Tips con Filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con Filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tubo de Polipropileno para Microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tubo de Polipropileno para Microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U
- Tubo de Polipropileno, Fondo Cónico Estéril x 15 mL

**5° Actividad: Amplificación**

- Kit Pcr en Tiempo Real para Detección y Cuantificación Viral de EBV x 24 Determinaciones
- Puntera (Tips) Estéril con Filtro 2 uL - 20 uL X 96
- Tips con Filtro 1000 UI x 96 U
- Tips Estéril con Filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tips Estéril Con Filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de Polipropileno para Microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U

**6° Actividad: Análisis de resultado****7° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro



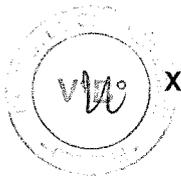
**PNT.DNCC. INEN.038. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE EPSTEIN BARR VIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. 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 Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.
- Líquidos orgánicos: 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.
- Tejido fresco: se realiza por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.
- TEEP: se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

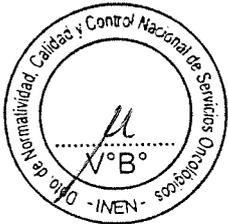
- Ácidos nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico viral.

**10.3. Recipiente:**

- Sangre venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Líquidos orgánicos: tubo estéril de 3 cc.
- Tejido fresco: frasco estéril y Cloruro de Sodio 9/1000
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Sangre venosa/médula ósea: 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 24 hrs.
- Líquidos orgánicos: iniciar el proceso inmediatamente.
- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente



**PNT.DNCC. INEN.038. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE EPSTEIN BARR VIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Basado en metodología descrita por Laus 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:**

Sangre venosa: Realizada por el personal del Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica.

Médula ósea: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.

Líquidos orgánicos: realizada por el Médico Cirujano Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.

Tejido fresco: realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

Tejido embebido en parafina (TEEP): obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**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:**

Sangre periférica/ médula ósea: proceso preanalítico 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, aquí se incluye el proceso de separación de plasma por medio de centrifugación por 10 min.

Líquidos orgánicos, tejido fresco: sigue el mismo proceso preanalítico y pasan directamente a la siguiente actividad.

TEEP: posterior a la revisión por el Patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina, se realizaran los pasos de Desparafinación por medio de batería de alcoholes.

**11.4 Extracción de Ácidos Nucléicos:**

Plasma/ líquidos orgánicos: proceso realizado por el equipo extracción de ácidos nucleicos, se realiza por medio del método de columnas con los reactivos de extracción de ácidos nucleicos virales (incluidos en el KIT IVD de PCR), además de la preparación de los controles internos; al final de la corrida los productos obtenidos, así como los controles internos son guardados a -20 °C hasta la siguiente actividad.

TEEP: se realiza la desparafinación por medio de batería de alcoholes: xilol y etanol; en posterior por medio del kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado y método de extracción de columnas: centrifugación y extracción del sobrenadante se obtendrá un pellet de ácido nucleico viral.



# PNT.DNCC. INEN.038. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE EPSTEIN BARR VIRUS V.01

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

Tejido fresco: se utiliza un tissue lisis buffer y proteinasa K, por medio de metodología de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá pellet de ácido nucléico viral.

### 11.5 Amplificación:

Se utilizan los reactivos del master (solución premezclada) incluido en el Kit PCR en tiempo real para detección y cuantificación viral de Epstein Barr (IVD), los productos de esta reacción son pasados a viales sensibles a la luz para ser usados en el equipo de PCR en tiempo real, donde se irán evidenciando las curvas de amplificación durante el proceso de la corrida.

### 11.6 Análisis de resultado:

Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos virales y gen control; el resultado final se expresa en "copias/ml." por medio de formula definida para el proceso; este valor será transformado en escala logarítmica para poder ser correlacionados con los resultados previos (2).

### 11.7 Elaboración y entrega de resultado:

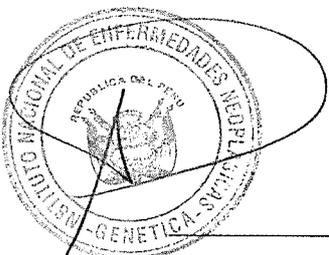
El biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de otros exámenes auxiliares por el médico genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taneja A, Chewning JH, Saad A. Viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY. 2019;2(2):e43.
2. Laus S, Kingsley L, Green M, Wadowsky R. Comparison of QIA Symphony Automated and QIAamp Manual DNA extraction Systems for Measuring Epstein-Barr virus DNA load in whole blood using real-time PCR. JMD. November 2011, vol. 13, No.6.

## XIII. ANEXO

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



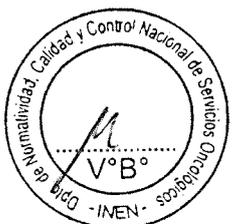
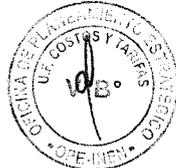


PNT.DNCC. INEN.038. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE EPSTEIN BARR VIRUS V.01

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

ANEXO N° 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

Table with 5 columns: VERSIÓN, PÁGINA, DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA, FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN), and AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN). Row 1: 01, 1-8, Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC...



**PNT.DNCC. INEN .039. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE BK VIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN  
VIRAL DE BK VIRUS****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección y cuantificación viral de BK Virus.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.08
- Código Tarifario INEN: 210737

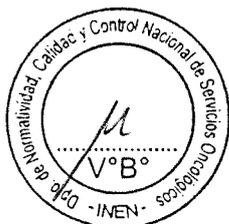
**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección y cuantificación viral de BK Virus, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

**IV. RESPONSABILIDADES**

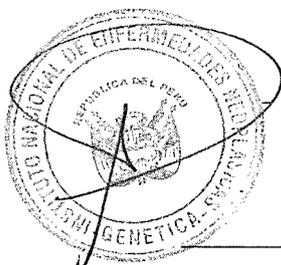
Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción de ácidos nucleicos, amplificación, 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.
- 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 del Departamento de Oncología Médica, médico oncólogo pediatra del Departamento de Oncología Pediátrica y Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía: se encargan de la toma de muestra de médula ósea, tejido fresco por medio de biopsias u obtención de líquidos orgánicos (líquido cefalorraquídeo, orina u otros líquidos orgánicos).
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- 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.

Ácido Nucleico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.



**PNT.DNCC. INEN .039. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE BK VIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- ADN Viral: Sigla de ácido desoxirribonucleico, proteínas complejas que se encuentra en el núcleo de las células y constituye el principal constituyente del material genético de los virus.
- ARN Viral: Sigla de ácido ribonucleico, ácido nucleico que participa en la síntesis de las proteínas y realiza la función de mensajero de la información genética en virus.
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido fresco.
- 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.
- Líquido Orgánico: Es esencial para el medio interno y externo de las células sanas. Contiene agua y sustancias disueltas como electrolitos. Cualquier cambio en este puede afectar la función celular.
- Muestra de sangre periférica: Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Pellet: Pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Plasma: Parte líquida de la sangre, linfa, líquido intersticial y cefalorraquídeo desprovisto de células, está formado por agua, proteínas, glúcidos y lípidos mayoritariamente.
- Punción de Médula Ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica de amplificación que consiste en la amplificación IN VITRO de un fragmento de ADN/ cDNA específico.
- 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.
- Tejido fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.
- Tejido parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de determinación de la carga viral de BK virus en pacientes en pre y postransplante de precursores hematopoyéticos (autólogo y alogénico), en pacientes inmunosuprimidos, en control por infección previa y otros (1).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos
- Computadora
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo.
- Equipo de extracción de ácidos nucleicos
- Equipo para determinación de PCR en tiempo real

**PNT.DNCC. INEN .039. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE BK VIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Espectrofotómetro
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrífuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Purificador vertical de metal
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.

**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

**7.3 Mobiliario**

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

**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:****1° Actividad: Toma de muestra**

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrupo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S

**PNT.DNCC. INEN .039. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE BK VIRUS V.01**

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

- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con edta

**2° Actividad: Registro de muestra**

- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

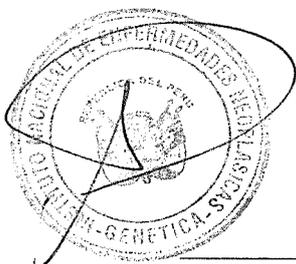
- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.

**4° Actividad: Extracción de ácido nucleicos**

- Gorro descartable unisex x 100 U
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con Filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 mL

**5° Actividad: amplificación**

- Kit PCR en tiempo real para detección y cuantificación viral de BKV (Ivd) x 24 determinaciones
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U

**6° Actividad: Análisis de resultado****7° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

**PNT.DNCC. INEN .039. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE BK VIRUS V.01**

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

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. 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.
- Líquidos orgánicos: 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.
- Tejido fresco: se realiza por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): se obtiene del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos Nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), Ácido Desoxirribonucleico Viral.

**10.3. Recipiente:**

- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula Ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Líquidos Orgánicos: tubo estéril de 3 cc.
- Tejido Fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Sangre venosa/médula ósea: 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 24 hrs.

**PNT.DNCC. INEN .039. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE BK VIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Líquidos orgánicos: iniciar el proceso inmediatamente.
- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente.

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

Basado en metodología descrita en la bibliografía actual (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:**

Sangre venosa: realizada por personal designado en el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica.

Médula ósea: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica o por el Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.

Líquidos orgánicos: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica o por el Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica

Tejido fresco: realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

Tejido embebido en parafina (TEEP): obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**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:**

Sangre periférica/médula ósea: 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, aquí se incluye el proceso de separación de plasma por medio de centrifugación por 10 min.

Líquidos orgánicos, tejido fresco: sigue el mismo proceso preanalítico y pasan directamente a la siguiente actividad.

TEEP: posterior a la revisión por el patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina, se realizaran los pasos de desparafinación por medio de batería de alcoholes.

**11.4 Extracción de Ácidos Nucléicos:**

Plasma/ líquidos orgánicos: proceso realizado por el equipo extracción de ácidos nucleicos, se realiza por medio del método de columnas con los reactivos de extracción de ácidos nucleicos virales (incluidos en el KIT IVD de PCR), además de la preparación de los controles internos; al final de la corrida los productos obtenidos, así como los controles internos son guardados a -20 °C hasta la siguiente actividad.

**PNT.DNCC. INEN .039. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE BK VIRUS V.01**

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

TEEP: se realiza la Desparafinación por medio de batería de alcoholes: xilol y etanol; en posterior por medio del kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado y método de extracción de columnas: centrifugación y extracción del sobrenadante se obtendrá un pellet de ácido nucleico viral.

Tejido fresco: se utiliza un tissue lisis buffer y proteinasa K, por medio de metodología de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá pellet de ácido nucleico viral.

**11.5 Amplificación:**

Se utilizan los reactivos del master (solución premezclada) incluido en el Kit PCR en tiempo real para detección y cuantificación viral de BKv (IVD), los productos de esta reacción son pasados a viales sensibles a la luz para ser usados en el equipo de PCR en tiempo real, donde se irán evidenciando las curvas de amplificación durante el proceso de la corrida.

**11.6 Análisis de resultado:**

Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos virales y gen control; el resultado final se expresa en "copias/ml" por medio de formula definida para el proceso; este valor será transformado en escala logarítmica para poder ser correlacionados con los resultados previos (2).

**11.7 Elaboración y entrega de resultado:**

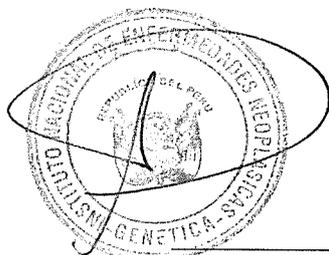
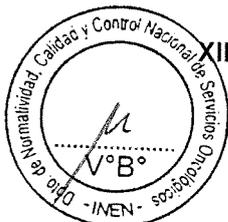
El biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de otros exámenes auxiliares por el médico genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Taneja A, Chewning JH, Saad A. Viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY. 2019;2(2):e43.
2. Laus S, Kingsley L, Green M, Wadowsky R. Comparison of QIAasymphony Automated and QIAamp Manual DNA extraction Systems for Measuring Epstein-Barr virus DNA load in whole blood using real-time PCR. JMD. November 2011, vol. 13, No.6.

**XIII. ANEXO**

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



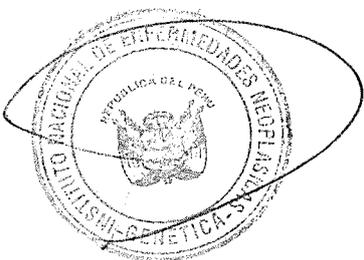
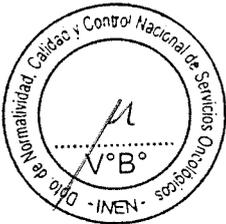
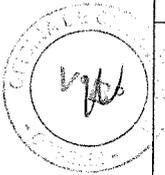


PNT.DNCC. INEN .039. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE BK VIRUS V.01

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

ANEXO N° 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

Table with 5 columns: VERSIÓN, PÁGINA, DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA, FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN), and AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN). Row 1: 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)., 11/12/2019, M.C. Pamela Mora Alferez

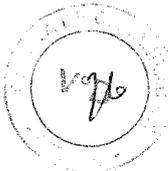


**PNT.DNCC. INEN. 040. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE ADENOVIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN  
VIRAL DE ADENOVIRUS****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección y cuantificación viral de adenovirus.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 87800.05
- Código Tarifario INEN: 210749

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección y cuantificación viral de Adenovirus en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

**IV. RESPONSABILIDADES**

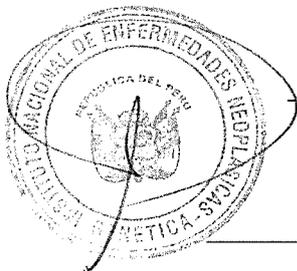
Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción de ácidos nucleicos, amplificación, 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.
- 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 del Departamento de Oncología Médica, médico oncólogo pediatra del Departamento de Oncología Pediátrica y Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía: se encargan de la toma de muestra de médula ósea, tejido fresco por medio de biopsias u obtención de líquidos orgánicos (líquido cefalorraquídeo, orina u otros líquidos orgánicos).
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

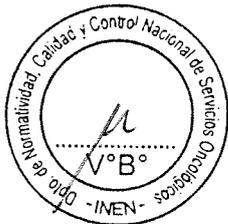
- Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA): Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.

Ácido Nucleico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.



**PNT.DNCC. INEN. 040. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE ADENOVIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

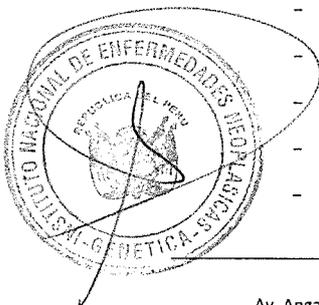
- ADN Viral: Sigla de ácido desoxirribonucleico, proteínas complejas que se encuentra en el núcleo de las células y constituye el principal constituyente del material genético de los virus.
- ARN Viral: Sigla de ácido ribonucleico, ácido nucleico que participa en la síntesis de las proteínas y realiza la función de mensajero de la información genética en virus.
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido fresco.
- 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.
- Líquido Orgánico: Es esencial para el medio interno y externo de las células sanas. Contiene agua y sustancias disueltas como electrolitos. Cualquier cambio en este puede afectar la función celular.
- Muestra de Sangre Periférica. - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Plasma: Parte líquida de la sangre, linfa, líquido intersticial y cefalorraquídeo desprovisto de células, está formado por agua, proteínas, glúcidos y lípidos mayoritariamente.
- Punción de Médula Ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica de amplificación que consiste en la amplificación IN VITRO de un fragmento de ADN/ cDNA específico.
- 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.
- Tejido Fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.
- Tejido Parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.

**SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de determinación de la carga viral de adenovirus en pacientes en pre y posttransplante de precursores hematopoyéticos (autólogo y alogénico), en pacientes inmunosuprimidos, en control por infección previa y otros (1).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos
- Computadora
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24 000 Btu tipo piso techo.
- Equipo de extracción de ácidos nucleicos
- Equipo para determinación de PCR en tiempo real.
- Espectrofotómetro



**PNT.DNCC. INEN. 040. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE ADENOVIRUS V.01**

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

- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrífuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Purificador vertical de metal
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.

**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

**7.3 Mobiliario**

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

**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:****1° Actividad: toma de muestra**

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S

**PNT.DNCC. INEN. 040. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE ADENOVIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con edta

**2° Actividad: registro de muestra**

- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**3° Actividad: procesamiento de muestra**

- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.

**4° Actividad: extracción de Ácido Nucleicos**

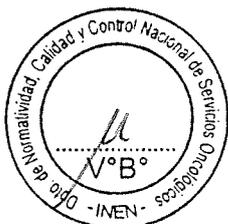
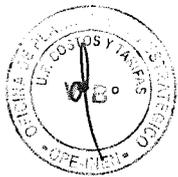
- Gorro descartable unisex x 100 U
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con Filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U
- Tubo de polipropileno, fondo cónico Estéril x 15 mL

**5° Actividad: amplificación**

- Kit PCR en tiempo real para detección y cuantificación de adenovirus (Ivd) x 24 determinaciones
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U

**6° Actividad: análisis de resultado****7° Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4



**PNT.DNCC. INEN. 040. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE ADENOVIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**MUESTRA****10.1. 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.
- Líquidos orgánicos: 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.
- Tejido fresco: se realiza por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos Nucleicos: Ácido ribonucleico (ARN), Ácido Desoxirribonucleico Viral.

**10.3. Recipiente:**

- Sangre venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Líquidos orgánicos: tubo estéril de 3cc.
- Tejido fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina

**10.4. Conservación y manejo:**

- Sangre venosa / Médula Ósea: 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 24 hrs.
- Líquidos orgánicos: iniciar el proceso inmediatamente.

**PNT.DNCC. INEN. 040. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE ADENOVIRUS V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente

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

Basado en metodología descrita en la bibliografía actual (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:**

Sangre venosa: realizada por personal técnico designado en el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica.

Médula ósea: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica o por el Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.

Líquidos orgánicos: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica o por el Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica

Tejido fresco: realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

Tejido embebido en parafina (TEEP): obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**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:**

Sangre periférica/médula ósea: 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, aquí se incluye el proceso de separación de plasma por medio de centrifugación por 10 min.

Líquidos orgánicos, tejido fresco: sigue el mismo proceso preanalítico y pasan directamente a la siguiente actividad.

TEEP: posterior a la revisión por el patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina, se realizaran los pasos de desparafinación por medio de batería de alcoholes.

**11.4 Extracción de ácidos nucleicos:**

Plasma/líquidos orgánicos: proceso realizado por el equipo extracción de ácidos nucleicos, se realiza por medio del método de columnas con los reactivos de extracción de ácidos nucleicos virales (incluidos en el KIT IVD de PCR), además de la preparación de los controles internos; al final de la corrida los productos obtenidos, así como los controles internos son guardados a -20 °C hasta la siguiente actividad.

TEEP: se realiza la desparafinación por medio de batería de alcoholes xilol y Etanol; en posterior por medio del kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o



# PNT.DNCC. INEN. 040. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE ADENOVIRUS V.01

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

parafinado y método de extracción de columnas: centrifugación y extracción del sobrenadante se obtendrá un pellet de ácido nucleico viral.

Tejido fresco: se utiliza un Tissue lisis buffer y proteinasa K, por medio de metodología de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá pellet de ácido nucleico viral.

## 11.5 Amplificación:

Se utilizan los reactivos del master (solución premezclada) incluido en el Kit PCR en tiempo real para detección y cuantificación de adenovirus (IVD), los productos de esta reacción son pasados a viales sensibles a la luz para ser usados en el equipo de PCR en tiempo real, donde se irán evidenciando las curvas de amplificación durante el proceso de la corrida.

## 11.6 Análisis de resultado:

Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos virales y gen control; el resultado final se expresa en "copias/ml" por medio de formula definida para el proceso; este valor será transformado en escala logarítmica para poder ser correlacionados con los resultados previos (2).

## 11.7 Elaboración y entrega de resultado:

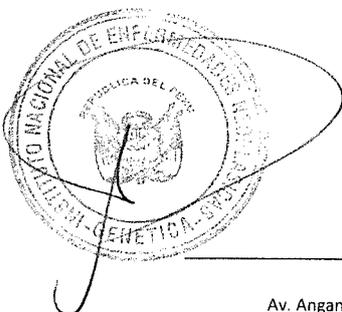
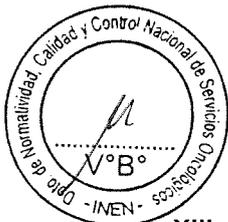
El biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de otros exámenes auxiliares por el médico genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taneja A, Chewning JH, Saad A. Viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY. 2019;2(2):e43
2. Laus S, Kingsley L, Green M, Wadowsky R. Comparison of QIA Symphony Automated and QIAamp Manual DNA extraction Systems for Measuring Epstein-Barr virus DNA load in whole blood using real-time PCR. JMD. November 2011, vol. 13, No.6

## XIII. ANEXO

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



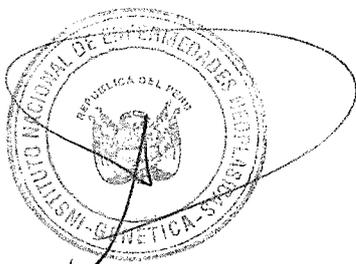
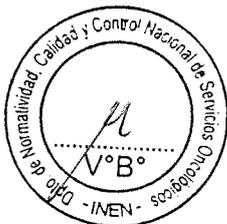
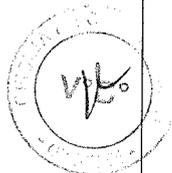


**PNT.DNCC. INEN. 040. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE ADENOVIRUS V.01**

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

**ANEXO N° 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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN.041. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE PARVOVIRUS B19, V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN  
VIRAL DE PARVOVIRUS B19****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección y cuantificación viral de parvovirus.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.19.
- Código Tarifario INEN: 210768.

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección y cuantificación de parvovirus, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción de ácidos nucleicos, amplificación, 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.
- 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 del Departamento de Oncología Médica, médico oncólogo pediatra del Departamento de Oncología Pediátrica y Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía: se encargan de la toma de muestra de médula ósea, tejido fresco por medio de biopsias u obtención de líquidos orgánicos (líquido cefalorraquídeo, orina u otros líquidos orgánicos).
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.

**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.

Función 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.

**PNT.DNCC. INEN.041. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE PARVOVIRUS B19, V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- 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.
- Líquido Orgánico: Es esencial para el medio interno y externo de las células sanas. Contiene agua y sustancias disueltas como electrolitos. Cualquier cambio en este puede afectar la función celular.
- Tejido Fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.
- Tejido Parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido fresco.
- Pellet: pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucléico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado nucleótido.
- Plasma: Parte líquida de la sangre, linfa, líquido intersticial y cefalorraquídeo desprovisto de células, está formado por agua, proteínas, glúcidos y lípidos mayoritariamente.
- ARN Viral: Sigla de ácido ribonucleico, ácido nucleico que participa en la síntesis de las proteínas y realiza la función de mensajero de la información genética en virus.
- ADN Viral: Sigla de ácido desoxirribonucleico, proteínas complejas que se encuentra en el núcleo de las células y constituye el principal constituyente del material genético de los virus.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica que consiste en la amplificación IN VITRO de un fragmento de ADN/ cDNA específico.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de determinación de la carga viral de Parvovirus B19 en pacientes en pre y postransplante de precursores hematopoyéticos (autólogo y alogénico), en pacientes inmunosuprimidos, en control por infección previa y otros (1).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos
- Computadora
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo.
- Equipo de extracción de ácidos nucleicos
- Equipo para determinación de PCR en Tiempo Real.

**PNT.DNCC. INEN.041. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE PARVOVIRUS B19, V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Espectrofotómetro
- Impresora de código de barras térmicas 102mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrifuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Purificador vertical de metal
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Teclado keyboard con puerto USB
- Unidad central de proceso-CPU de 3.1GHz
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.

**7.2 Instrumentales**

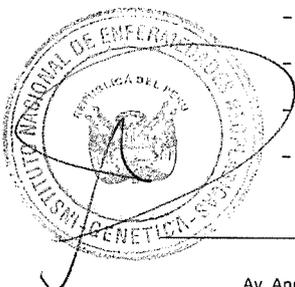
- Micropipeta volumen variable 0.5 uL -10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL -200 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 1000 uL

**7.3 Mobiliario**

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

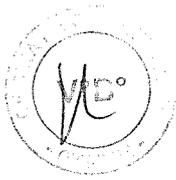
**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:****1° Actividad: Toma de muestra**

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m



**PNT.DNCC. INEN.041. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE PARVOVIRUS B19, V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

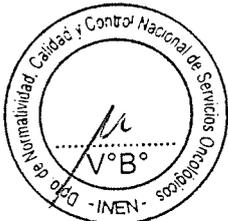
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA

**2° Actividad: Registro de muestra**

- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

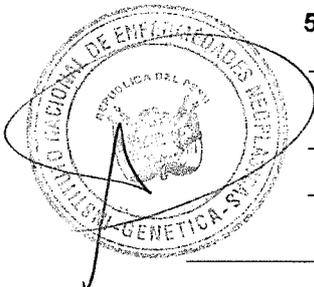
- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.

**4° Actividad: Extracción de ácido nucleicos**

- Alcohol etílico (Etanol) 98 % x 2.5 L
- Gorro descartable Unisex X 100 U
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips con filtro 1000 UI X 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL X 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500 U
- Tubo de polipropileno, fondo cónico Estéril x 15 mL

**5° Actividad: Amplificación**

- Kit PCR en tiempo real para detección y cuantificación viral de parvovirus (Ivd) x 24 Determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U



**PNT.DNCC. INEN.041. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE PARVOVIRUS B19, V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U

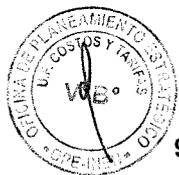
**6° Actividad: Análisis de resultado****7° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

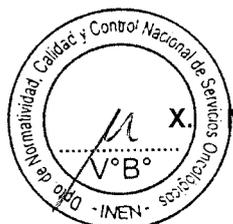
**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. Obtención de la muestra:**

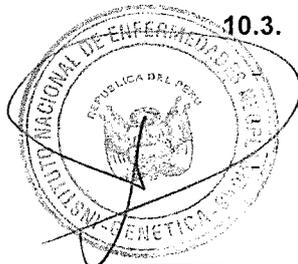
- Sangre venosa: se realiza en el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula ósea: se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.
- Líquidos orgánicos: 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.
- Tejido fresco: se realiza por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico viral.

**10.3. Recipiente:**

- Sangre venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Líquidos orgánicos: tubo estéril de 3cc.



**PNT.DNCC. INEN.041. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE PARVOVIRUS B19, V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tejido fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Sangre venosa/médula ósea: 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.
- Líquidos orgánicos: iniciar el proceso inmediatamente.
- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente.

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

Basado en metodología descrita en la bibliografía actual (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:**

Sangre venosa: realizada por personal técnico designado en el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica.

Médula ósea: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica o por el Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.

Líquidos orgánicos: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica o por el Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica

Tejido fresco: realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

Tejido embebido en parafina (TEEP): obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**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:**

Sangre periférica/médula ósea: 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, aquí se incluye el proceso de separación de plasma por medio de centrifugación por 10 min.

Líquidos orgánicos, tejido fresco: sigue el mismo proceso preanalítico y pasan directamente a la siguiente actividad.

TEEP: posterior a la revisión por el médico patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina, se realizaran los pasos de Desparafinación por medio de batería de alcoholes.

**PNT.DNCC. INEN.041. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE PARVOVIRUS B19, V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.4 Extracción de ácidos nucleicos:**

Plasma/ Líquidos orgánicos: proceso realizado por el equipo extracción de ácidos nucleicos, se realiza por medio del método de columnas con los reactivos de extracción de ácidos nucleicos virales (incluidos en el KIT IVD de PCR), además de la preparación de los controles internos; al final de la corrida los productos obtenidos, así como los controles internos son guardados a -20°C hasta la siguiente actividad.

TEEP: se realiza la desparafinación por medio de batería de alcoholes: Xilol y Etanol; en posterior por medio del kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado y método de extracción de columnas: centrifugación y extracción del sobrenadante se obtendrá un pellet de ácido nucleico viral.

Tejido fresco: se utiliza un tissue lisis buffer y proteinasa K, por medio de metodología de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá pellet de ácido nucleico viral.

**11.5 Amplificación:**

Se utilizan los reactivos del master (solución premezclada) incluido en el Kit PCR en tiempo real para detección y cuantificación viral de parvovirus (IVD), los productos de esta reacción son pasados a viales sensibles a la luz para ser usados en el equipo de PCR en tiempo real, donde se irán evidenciando las curvas de amplificación durante el proceso de la corrida.

**11.6 Análisis de resultado:**

Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos virales y gen control; el resultado final se expresa en "copias/ml." por medio de fórmula definida para el proceso; este valor será transformado en escala logarítmica para poder ser correlacionados con los resultados previos (2).

**11.7 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. Taneja A, Chewning JH, Saad A. Viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY*. 2019;2(2):e43
2. Laus S, Kingsley L, Green M, Wadowsky R. Comparison of QIAasymphony Automated and QIAamp Manual DNA extraction Systems for Measuring Epstein-Barr virus DNA load in whole blood using real-time PCR. *JMD*. November 2011, vol. 13, No.6

**XIII. ANEXO**

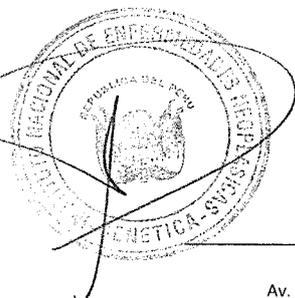
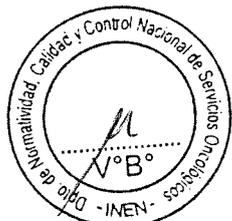
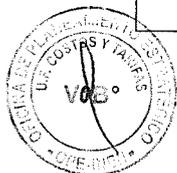
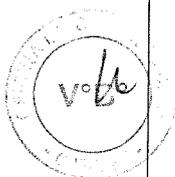
- Anexo N° 1: Control de cambios y mejoras.



**PNT.DNCC. INEN.041. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE PARVOVIRUS B19, V. 01**  
 Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
 Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

**ANEXO N° 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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez

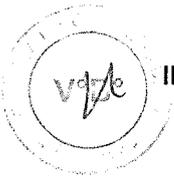


**PNT.DNCC. INEN.042. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS B V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y  
CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS B****I. OBJETIVO**

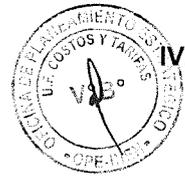
Normalizar el procedimiento de Detección y cuantificación viral de Hepatitis B.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.07
- Código Tarifario INEN: 210738

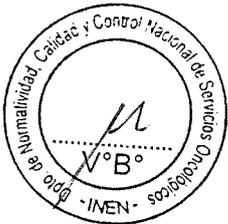
**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección y cuantificación viral de Hepatitis B, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, desde su recepción hasta el reporte del resultado obtenido.

**IV. RESPONSABILIDADES**

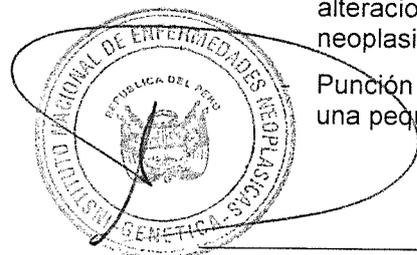
Son responsables del cumplimiento del presente documento normativo, el personal asistencial, administrativo y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción de ácidos nucleicos, amplificación, 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.
- 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 del Departamento de Oncología Médica, médico oncólogo pediatra del Departamento de Oncología Pediátrica y Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía: se encargan de la toma de muestra de médula ósea, tejido fresco por medio de biopsias u obtención de líquidos orgánicos (líquido cefalorraquídeo, orina u otros líquidos orgánicos).
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.

**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.042. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS B V.01**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.
- Líquido Orgánico: Es esencial para el medio interno y externo de las células sanas. Contiene agua y sustancias disueltas como electrolitos. Cualquier cambio en este puede afectar la función celular.
- Tejido Fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.
- Tejido Parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido fresco.
- 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.
- Plasma: Parte líquida de la sangre, linfa, líquido intersticial y ceforraquídeo desprovisto de células, está formado por agua, proteínas, glúcidos y lípidos mayoritariamente.
- ARN Viral: Sigla de ácido ribonucleico, ácido nucleico que participa en la síntesis de las proteínas y realiza la función de mensajero de la información genética en virus.
- ADN Viral: Sigla de ácido desoxirribonucleico, proteínas complejas que se encuentra en el núcleo de las células y constituye el principal constituyente del material genético de los virus.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica de amplificación que consiste en la amplificación IN VITRO de un fragmento de ADN/ cDNA específico.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de determinación de la carga viral de Hepatitis B en pacientes en pre y postransplante de precursores hematopoyéticos (autólogo y alogénico), en pacientes inmunosuprimidos, en control por infección previa y otros (1).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos
- Computadora
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo.
- Equipo de extracción de ácidos nucleicos
- Equipo para determinación de PCR en tiempo real.

**PNT.DNCC. INEN.042. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS B V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Espectrofotómetro
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg.
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrífuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Purificador vertical de metal
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.

**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

**7.3 Mobiliario**

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

**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:****1° Actividad: Toma de muestra**

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S



**PNT.DNCC. INEN.042. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS B V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**6° Actividad: Análisis de resultado****7° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para xerox cod. Ref. 106r02318 negro.

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. 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.
- Líquidos orgánicos: 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.
- Tejido fresco: se realiza por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico viral.

**10.3. Recipiente:**

- Sangre venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio
- Médula ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio
- Líquidos orgánicos: tubo estéril de 3 cc
- Tejido fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina

**10.4. Conservación y manejo:**

Sangre venosa/médula ósea: es ideal realizar el inicio del proceso inmediatamente a la toma de muestra, de no ser posible se conservan a temperatura ambiente

**PNT.DNCC. INEN.042. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS B V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

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 24 hrs.

- Líquidos orgánicos: iniciar el proceso inmediatamente
- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente

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

Basado en metodología descrita en la bibliografía actual (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:**

Sangre venosa: realizada por personal técnico designado en el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica.

Médula ósea: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica o por el Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.

Líquidos orgánicos: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica o por el Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica

Tejido fresco: realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

Tejido embebido en parafina (TEEP): obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**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:**

Sangre periférica/ médula ósea: 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, aquí se incluye el proceso de separación de plasma por medio de centrifugación por 10 min.

Líquidos orgánicos, tejido fresco: sigue el mismo proceso preanalítico y pasan directamente a la siguiente actividad.

TEEP: posterior a la revisión por el patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina, se realizaran los pasos de desparafinación por medio de batería de alcoholes.

**11.4 Extracción de ácidos nucleicos:**

Plasma/ líquidos orgánicos: proceso realizado por el equipo extracción de ácidos nucleicos, se realiza por medio del método de columnas con los reactivos de extracción de ácidos nucleicos virales (incluidos en el KIT IVD de PCR), además de la preparación de los controles internos; al final de la corrida los productos obtenidos, así como los controles internos son guardados a -20°C hasta la siguiente actividad.

**PNT.DNCC. INEN.042. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS B V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

TEEP: se realiza la desparafinación por medio de batería de alcoholes: xilol y etanol; en posterior por medio del kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado y método de extracción de columnas: centrifugación y extracción del sobrenadante se obtendrá un pellet de ácido nucleico viral.

Tejido fresco: se utiliza un tissue lisis buffer y proteinasa K, por medio de metodología de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá pellet de ácido nucleico viral.

**11.5 Amplificación:**

Se utilizan los reactivos del master (solución premezclada) incluido en el kit PCR en tiempo real para detección y cuantificación viral de hepatitis B (IVD), los productos de esta reacción son pasados a viales sensibles a la luz para ser usados en el equipo de PCR en tiempo real, donde se irán evidenciando las curvas de amplificación durante el proceso de la corrida.

**11.6 Análisis de resultado:**

Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos virales y gen control; el resultado final se expresa en "UI/mL" por medio de fórmula definida para el proceso; este valor será transformado en escala logarítmica para poder ser correlacionados con los resultados previos (2).

**11.7 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. Taneja A, Chewning JH, Saad A. Viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY. 2019;2(2):e43
2. Caliendo AM, Valsamakias A, Bremer JW, Ferreira-Gonzalez A, Granger S, Sabatini L, et al. Multilaboratory Evaluation of Real-Time PCR Tests for Hepatitis B Virus DNA Quantification. J Clin Microbiol. agosto de 2011;49(8):2854-8.

**XIII. ANEXO**

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



PERÚ

Sector Salud

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

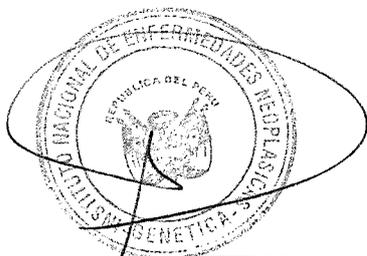


### PNT.DNCC. INEN.042. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS B V.01

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

#### ANEXO N° 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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN.043. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS C V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN  
VIRAL DE HEPATITIS C****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección y cuantificación viral de Hepatitis C.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.12
- Código Tarifario INEN: 210739

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de detección y cuantificación viral de Hepatitis C, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción de ácidos nucleicos, amplificación, 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.
- 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 / Cirujano de los Departamentos de Oncología Médica/ Pediátrica y Departamentos de la Dirección de Cirugía: se encargan de la toma de muestra de médula ósea, tejido fresco por medio de biopsias u obtención de líquidos orgánicos (líquido cefalorraquídeo, orina u otros líquidos orgánicos).
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.

**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.043. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS C V.01**

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.
- Líquido Orgánico: Es esencial para el medio interno y externo de las células sanas. Contiene agua y sustancias disueltas como electrolitos. Cualquier cambio en este puede afectar la función celular.
- Tejido Fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.
- Tejido Parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido fresco.
- 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.
- Plasma: Parte líquida de la sangre, linfa, líquido intersticial y ceforraquídeo desprovisto de células, está formado por agua, proteínas, glúcidos y lípidos mayoritariamente.
- ARN Viral: Sigla de ácido ribonucleico, ácido nucleico que participa en la síntesis de las proteínas y realiza la función de mensajero de la información genética en virus.
- ADN Viral: Sigla de ácido desoxirribonucleico, proteínas complejas que se encuentra en el núcleo de las células y constituye el principal constituyente del material genético de los virus.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica de amplificación que consiste en la amplificación IN VITRO de un fragmento de ADN/ cDNA específico.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de Determinación de la carga viral de Hepatitis C en pacientes en pre y postransplante de precursores hematopoyéticos (autólogo y alogénico), en pacientes inmunosuprimidos, en control por infección previa y otros (1).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos
- Computadora
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo
- Equipo de extracción de ácidos nucleicos

**PNT.DNCC. INEN.043. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS C V.01**

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

- Equipo para determinación de PCR en tiempo real
- Espectrofotómetro
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg.
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrífuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitorplano de 20 In
- Purificador vertical de metal
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo

**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

**7.3 Mobiliario**

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

**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:****1° Actividad: Toma de muestra**

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.

**PNT.DNCC. INEN.043. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS C V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA

**2° Actividad: Registro de muestra**

- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

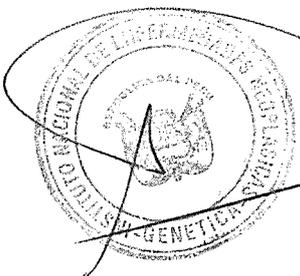
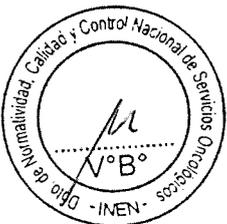
- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.

**4° Actividad: Extracción de Ácido Nucleicos**

- Alcohol etílico (Etanol) 98% x 2.5 L
- Gorro descartable Unisex X 100 U
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips con filtro 1000 UI X 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL x 500 U
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril x 15 mL

**5° Actividad: Amplificación**

- Kit PCR en tiempo real para detección y cuantificación viral de hepatitis C (Ivd) x 24 determinaciones.
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U



**PNT.DNCC. INEN.043. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS C V.01**

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

- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U

**6° Actividad: Análisis de resultado****7° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. 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.
- Líquidos orgánicos: 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.
- Tejido fresco: se realiza por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico viral.

**10.3. Recipiente:**

- Sangre venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Médula ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Líquidos orgánicos: tubo estéril de 3 cc.
- Tejido fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**PNT.DNCC. INEN.043. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS C V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**10.4. Conservación y manejo:**

- Sangre venosa/médula ósea: 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 24 hrs.
- Líquidos orgánicos: iniciar el proceso inmediatamente.
- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente.

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

Basado en metodología descrita en la bibliografía actual (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:**

Sangre venosa: realizada por personal técnico designado en el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica.

Médula ósea: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica o por el Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.

Líquidos orgánicos: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica o por el Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica

Tejido fresco: realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

Tejido embebido en parafina (TEEP): obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**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:**

Sangre periférica/ médula ósea: 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, aquí se incluye el proceso de separación de plasma por medio de centrifugación por 10 min.

Líquidos orgánicos, tejido fresco: sigue el mismo proceso preanalítico y pasan directamente a la siguiente actividad.

TEEP: posterior a la revisión por el médico patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina, se realizaran los pasos de desparafinación por medio de batería de alcoholes.

**PNT.DNCC. INEN.043. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS C V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.4 Extracción de ácidos nucleicos:**

Plasma/líquidos orgánicos: proceso realizado por el equipo extracción de ácidos nucleicos, se realiza por medio del método de columnas con los reactivos de extracción de ácidos nucleicos virales (incluidos en el KIT IVD de PCR), además de la preparación de los controles internos; al final de la corrida los productos obtenidos, así como los controles internos son guardados a -20 °C hasta la siguiente actividad.

TEEP: se realiza la desparafinación por medio de batería de alcoholes: Xilol y etanol; en posterior por medio del kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado y método de extracción de columnas: centrifugación y extracción del sobrenadante se obtendrá un pellet de ácido nucleico viral.

Tejido fresco: se utiliza un tissue lisis buffer y proteinasa K, por medio de metodología de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá pellet de ácido nucleico viral.

**11.5 Amplificación:**

Se utilizan los reactivos del master (solución premezclada) incluido en el Kit PCR en tiempo real para detección y cuantificación viral de hepatitis C (IVD), los productos de esta reacción son pasados a viales sensibles a la luz para ser usados en el equipo de PCR en tiempo real, donde se irán evidenciando las curvas de amplificación durante el proceso de la corrida.

**11.6 Análisis de resultado:**

Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos virales y gen control; el resultado final se expresa en "UI/mL" por medio de fórmula definida para el proceso; este valor será transformado en escala logarítmica para ser correlacionados con los resultados previos (2).

**11.7 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. Taneja A, Chewing JH, Saad A. Viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY. 2019;2(2):e43.
2. Halfon P, Bourlière M, Pénaranda G, Khiri H, Ouzan D. Real-Time PCR Assays for Hepatitis C Virus (HCV) RNA Quantitation Are Adequate for Clinical Management of Patients with Chronic HCV Infection. J Clin Microbiol. julio de 2006;44(7):2507-11.

**XIII. ANEXO**

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

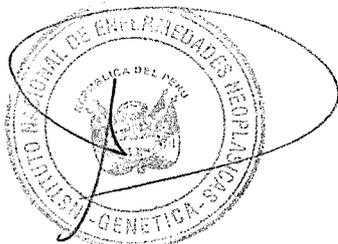
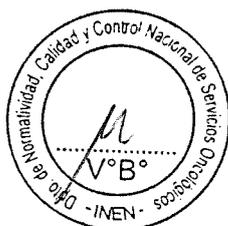


PNT.DNCC. INEN.043. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HEPATITIS C V.01

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

ANEXO N° 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

Table with 5 columns: VERSIÓN, PÁGINA, DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA, FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN), and AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN). Row 1: 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)., 11/12/2019, M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN.044. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HERPES VIRUS 6 V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN  
VIRAL DE HERPES VIRUS 6****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección y cuantificación viral de Herpes Virus 6.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 87533.09
- Código Tarifario INEN: 210750

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de detección y cuantificación viral de Herpes Virus 6, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción de ácidos nucleicos, amplificación, 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.
- 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/Cirujano de los Departamentos de Oncología Médica/ Pediátrica y Departamentos de la Dirección de Cirugía: se encargan de la toma de muestra de médula ósea, tejido fresco por medio de biopsias u obtención de líquidos orgánicos (líquido cefalorraquídeo, orina u otros líquidos orgánicos).
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.

**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.044. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HERPES VIRUS 6 V.01**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.
- Líquido Orgánico: Es esencial para el medio interno y externo de las células sanas. Contiene agua y sustancias disueltas como electrolitos. Cualquier cambio en este puede afectar la función celular.
- Tejido Fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.
- Tejido Parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido fresco.
- 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.
- Plasma: Parte líquida de la sangre, linfa, líquido intersticial y cefalorraquídeo desprovisto de células, está formado por agua, proteínas, glúcidos y lípidos mayoritariamente.
- ARN Viral: Sigla de ácido ribonucleico, ácido nucleico que participa en la síntesis de las proteínas y realiza la función de mensajero de la información genética en virus.
- ADN Viral: Sigla de ácido desoxirribonucleico, proteínas complejas que se encuentra en el núcleo de las células y constituye el principal constituyente del material genético de los virus.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica de amplificación que consiste en la amplificación IN VITRO de un fragmento de ADN/ cDNA específico.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de Determinación de la carga viral de herpes virus 6 en pacientes en pre y postransplante de precursores hematopoyéticos (autólogo y alogénico), en pacientes inmunosuprimidos, en control por infección previa y otros (1).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos
- Computadora
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo.
- Equipo de extracción de ácidos nucleicos

**PNT.DNCC. INEN.044. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HERPES VIRUS 6 V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Equipo para determinación de PCR en tiempo real.
- Espectrofotómetro
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrifuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Purificador vertical de metal
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.

**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

**7.3 Mobiliario**

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

**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:****1° Actividad: Toma de muestra**

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.

**PNT.DNCC. INEN.044. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HERPES VIRUS 6 V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel toalla x 300 m
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA

**2° Actividad: Registro de muestra**

- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para xerox cod. Ref. 106r02318 negro

**3° Actividad: Procesamiento de muestra**

- Bolsa de polipropileno de 72 cm x 51 cm color rojo
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Mandilón descartable talla estándar
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Tacho de plástico 25 L aprox.

**4° Actividad: Extracción de Ácido Nucleicos**

- Alcohol etílico (Etanol) 98% x 2.5 L
- Gorro descartable unisex X 100 U
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips con filtro 1000 UI X 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL X 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500 U
- Tubo de polipropileno, fondo cónico estéril X 15 mL

**5° Actividad: Amplificación**

- Kit PCR en tiempo real para detección y cuantificación viral de Herpes 6 (Ivd) x 24 determinaciones.
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Tips con filtro 1000 UI x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI x 96 U

**PNT.DNCC. INEN.044. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HERPES VIRUS 6 V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI x 96 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U

**6° Actividad: Análisis de resultado****7° Actividad: Elaboración y entrega de resultado**

- Papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para xerox cod. ref. 106r02318 negro

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. 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.
- Líquidos Orgánicos: 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.
- Tejido Fresco: se realiza por la Departamentos de la Dirección de Cirugía.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos Nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), Ácido Desoxirribonucleico Viral.

**10.3. Recipiente:**

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

Líquidos orgánicos: tubo estéril de 3 cc.

Tejido fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000.

**PNT.DNCC. INEN.044. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HERPES VIRUS 6 V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Sangre Venosa/Médula Ósea: 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 24 hrs.
- Líquidos orgánicos: iniciar el proceso inmediatamente.
- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente.

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

Basado en metodología descrita en la bibliografía actual (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:**

Sangre venosa: realizada por personal técnico designado en el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica.

Médula ósea: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica o por el Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.

Líquidos orgánicos: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica o por el Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica

Tejido fresco: realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

Tejido embebido en parafina (TEEP): obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**11.2 Registro de la muestra:**

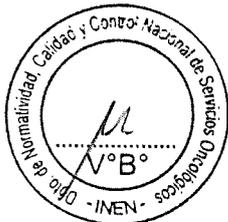
Recepción de muestra por personal administrativo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, así como registro con codificación interna, realizada por el Biólogo.

**11.3 Procesamiento de la muestra:**

Sangre periférica/médula ósea: 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, aquí se incluye el proceso de separación de plasma por medio de centrifugación por 10 min.

Líquidos orgánicos, tejido fresco: sigue el mismo proceso preanalítico y pasan directamente a la siguiente actividad.

TEEP: Posterior a la revisión por el médico patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina, se realizaran los pasos de Desparafinación por medio de batería de alcoholes.



**PNT.DNCC. INEN.044. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HERPES VIRUS 6 V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.4 Extracción de ácidos nucleicos:**

Plasma/líquidos orgánicos: proceso realizado por el equipo extracción de ácidos nucleicos, se realiza por medio del método de columnas con los reactivos de extracción de ácidos nucleicos virales (incluidos en el KIT IVD de PCR), además de la preparación de los controles internos; al final de la corrida los productos obtenidos, así como los controles internos son guardados a -20 °C hasta la siguiente actividad.

TEEP: se realiza la Desparafinación por medio de batería de alcoholes xilol y etanol; en posterior por medio del kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado y método de extracción de columnas: centrifugación y extracción del sobrenadante se obtendrá un pellet de ácido nucleico viral.

Tejido fresco: se utiliza un tissue lisis buffer y proteinasa K, por medio de metodología de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá pellet de ácido nucleico viral.

**11.5 Amplificación:**

Se utilizan los reactivos del master (solución premezclada) incluido en el Kit PCR en tiempo real para detección y cuantificación viral de herpes 6 C (IVD), los productos de esta reacción son pasados a viales sensibles a la luz para ser usados en el equipo de PCR en tiempo real, donde se irán evidenciando las curvas de amplificación durante el proceso de la corrida.

**11.6 Análisis de resultado:**

Se analizan las curvas de amplificación por medio de los estándares de plásmidos virales y gen control; el resultado final se expresa en "copias/mL" por medio de formula definida para el proceso; este valor será transformado en escala logarítmica para ser correlacionados con los resultados previos (2).

**11.7 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. Taneja A, Chewning JH, Saad A. Viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY. 2019;2(2):e43.
2. Laus S, Kingsley L, Green M, Wadowsky R. Comparison of QIA Symphony Automated and QIAamp Manual DNA extraction Systems for Measuring Epstein-Barr virus DNA load in whole blood using real-time PCR. JMD. November 2011, vol. 13, No.6.

**XIII. ANEXOS**

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

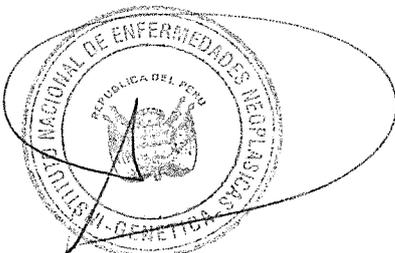
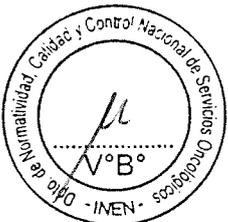
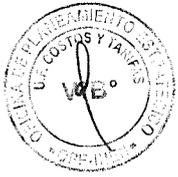
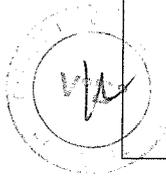


PNT.DNCC. INEN.044. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN VIRAL DE HERPES VIRUS 6 V.01

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

ANEXO N° 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

Table with 5 columns: VERSIÓN, PÁGINA, DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA, FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN), and AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN). Row 1: 01, 1-8, Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC...



**PNT.DNCC. INEN.045. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA EWING V.01**

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

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA EWING****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento del panel de detección de genes de fusión para Sarcoma Ewing por PCR en tiempo real y PCR convencional.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.35
- Código Tarifario INEN: 210769

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de panel de detección de genes de fusión para Sarcoma Ewing, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de geles, análisis y emisión de resultado.
- 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 Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.
- Médico Cirujano de los Departamentos de la Dirección de Cirugía: realiza la toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica) previa coordinación con el Departamento de Patología Clínica.

**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.
- Tejido fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.
- Tejido parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido embebido en parafina.

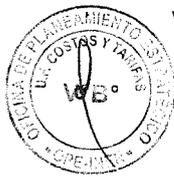
**PNT.DNCC. INEN.045. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA EWING V.01**

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

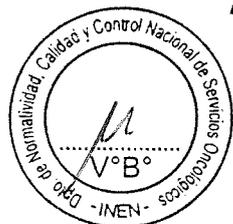
- Pellet: Pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico (ADN): 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 detección de genes de fusión para Sarcoma Ewing en pacientes con estudios anatomopatológicos con características de células redondas para confirmar sospecha diagnóstica; en algunos casos puede definir pronóstico y manejo (1).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos
- Computadora
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo.
- Equipo de extracción de ácidos nucleicos
- Equipo para determinación de PCR en tiempo real.
- Espectrofotómetro
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg.
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrifuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Purificador vertical de metal
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Vortex Genie 2 Mixer, color blanco humo.



**PNT.DNCC. INEN.045. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA EWING V.01**

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

**7.2 Instrumentales**

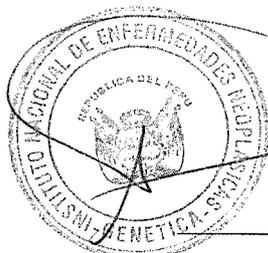
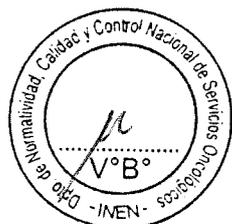
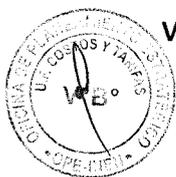
- Micropipeta volumen variable 0.5 uL - 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL - 200 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL - 1000 uL

**7.3 Mobiliario**

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

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

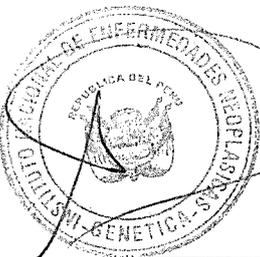
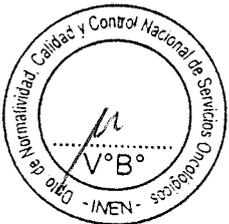
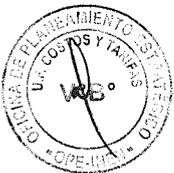
- Agua para PCR x 500 mL
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98% x 2.5 L
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Buffer tris acetato - EDTA 10x x 1 L
- Calibrador para ARN para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000x x 200 uL
- Cuchilla descartable de perfil alto para microtomo de rotación x 50
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Gen *ews-fli1* tipo 1 y 2
  - Primer *ews* f: 5-ccaagtcaatagccaacag-3 x 1000 determinaciones
  - Primer *fli1* r: 5-ggccagaattcatgtattgc-3 x 1000 determinaciones
  - Sonda *ews/fli1* tipo 1 fam-acgggcagcaga/acccttcttat-tamra x 1000 determinaciones
  - Sonda *ews/fli1n* tipo 2 fam-acgggcagcaga/gttcactgct-tamra x 1000 determinaciones
  - Control positivo del gen de fusión *ewsr/fli-1* tipo 1 x 100 uL
  - Control positivo del gen de fusión *ewsr/fli-1* tipo 2 x 100 uL
- Gen referencia *mrpl19*



**PNT.DNCC. INEN.045. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA EWING V.01**

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

- Primer mrpl19 f: 5'-ggaagaggacttgagctact-3' x 1000 determinaciones
- Primer mrpl19 r: 5'-tcctggaccgaggattat-3' x 1000 determinaciones
- Sonda mrpl19 fam-tcgaaggacaagggtctgagattg-tamra x 1000 determinaciones
- Gen ewr-erg
  - Primer ewr f: 5-ccaagtcaatatagccaacag-3 x 1000 determinaciones
  - Primer erg r: 5-tcaggaggaactgccaag-3 x 1000 determinaciones
  - Control positivo del gen de fusión ewsr/erg x 100 uL
- Gen ewr-etv1
  - Primer ewr/etv1 f: 5-acagccaagctccaagtc-3 x 1000 determinaciones
  - Primer ewr/etv1 r: 5-tgtgggtcctcccgatac-3 x 1000 determinaciones
  - Control positivo del gen de fusión ewsr/etv1 x 100 uL
- Gen ewr-etv4
  - Primer ewr/etv4 f: 5-tctacagccaagctcc-3 x 1000 determinaciones
  - Primer ewr/etv4 r: 5-gagaagccctctgtgtgg-3 x 1000 determinaciones
  - Control positivo del gen de fusión ewsr/etv4 x 100 uL
- Gen ewr-fev
  - Primer ewr/fev f: 5-tggtggaccatgatgaag-3 x 1000 determinaciones
  - Primer ewr/fev r: 5-tcgggttctcccgtccttg-3 x 1000 determinaciones
  - Control positivo del gen de fusión ewsr/fev x 100 uL
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Kit enzima hot star taq polimerasa x 250 U con buffer y mgc12
- Kit para la extracción de ARN total de tejido formolado y/o parafinado x 50 reacciones
- Mandilón descartable talla M
- Marcador de peso molecular (100 pb ladder) x 250 uL
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Placa de 96 pocillos color blanco para equipo para prueba pcr en tiempo real cobas 4800 x 50
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Solución premezclada para PCR tiempo real concentración 2x x 200 determinaciones
- Taño de plástico 25 L aprox.
- Tips con filtro 1000 uL x 96 U



**PNT.DNCC. INEN.045. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA EWING V.01**

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 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Tips 0.5 uL -10 uL x 500 papel bond 75 g tamaño A4
- Tóner de impresión para Xerox cod. ref. 106r02318 negro
- Tubo de polipropileno 200 µl para pcr con tapa plana x 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 U
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 uL con tapa x 1000 U
- Xilol q.p. X 1 L

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**MUESTRA****10.1. Obtención de la muestra:**

- Tejido fresco: se realiza por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

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

**10.3. Recipiente:**

- Tejido fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente.

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

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

**PNT.DNCC. INEN.045. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA EWING V.01**

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

**11.1 Toma de muestra:**

Tejido fresco: muestra obtenida por procedimiento realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

Tejido embebido en parafina (TEEP): obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**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 al proceso, en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar y disposición de inicio de trabajo, en el caso de tejido fresco pasa directamente a la siguiente actividad; en el caso de TEEP, se realiza posterior a la revisión por el Médico Patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina e ingresa al proceso de desparafinación por medio de batería de alcoholes (Xilol).

**11.4 Extracción y cuantificación de ARN:**

Por medio del kit para la extracción de ARN total de tejido formolado y/o parafinado y por metodología de centrifugación, lavados y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular.

Tejido fresco: se utiliza un tissue lysis buffer y proteinasa K, por medio de metodología de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá pellet de ácido nucleico (ARN).

Cuantificación: 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 100 ng/uL.

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

El ARN purificado, obtenido en la actividad previa, son transformados a ADN complementario por medio kit de enzima transcriptasa reversa y un ciclo de activación en el termociclador.

- Primera Amplificación:

- PCR en tiempo real: Gen de fusión EWS-FLI1 tipo 1 y 2 y gen de referencia MRLP19: se utiliza la Solución premezclada para PCR tiempo real que contiene la master mix necesaria para el proceso (que incluye la enzima polimerasa para la amplificación) y la sonda taqman, además de los primers del gen de fusión específica y gen de referencia 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.
- PCR convencional: Genes de fusión EWS/ERG, EWS/ETV1, EWS/ETV4, EWS/FEV y gen de referencia MRLP19: se usan primers específicos para los genes de fusión y gen de referencia, 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 las regiones específicas.



# PNT.DNCC. INEN.045. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA EWING V.01

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

## 11.6 Preparación de Gel:

En el caso de los genes de fusión obtenidos por PCR convencional, 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).

## 11.7 Análisis de resultado:

- PCR tiempo real: se analizan las curvas de amplificación para definir la presencia de la expresión génica, se considera el umbral de amplificación (Ct) de 35 ciclos; si la curva amplifica con un Ct < 35 ciclos se considera positivo para la presencia de la fusión génica. El resultado final se expresa como detectado o no detectado según bibliografía (2) y protocolos internos.
- PCR convencional: 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 los genes: EWS/ERG: 154 pb, EWS/ETV1: 98 pb, EWS/ETV4: 104 pb, EWS/FEV: 80 pb) según bibliografía (2) y protocolos internos.



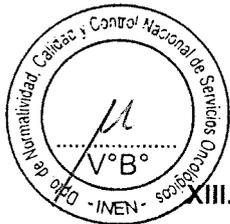
## 11.8 Elaboración y entrega de Resultado:

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.



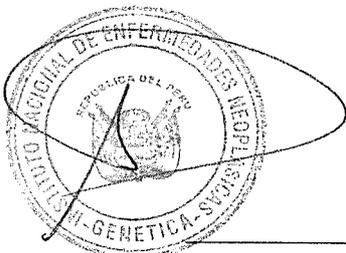
## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taneja A, Chewning JH, Saad A. Viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY. 2019;2(2):e43.
2. Halfon P, Bourlière M, Pénaranda G, Khiri H, Ouzan D. Real-Time PCR Assays for Hepatitis C Virus (HCV) RNA Quantitation Are Adequate for Clinical Management of Patients with Chronic HCV Infection. J Clin Microbiol. julio de 2006;44(7):2507-11.



## XIII. ANEXO

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



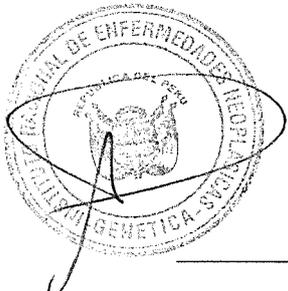
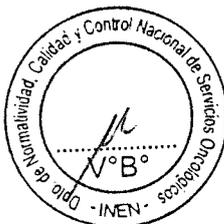


**PNT.DNCC. INEN.045. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA EWING V.01**

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

**ANEXO N° 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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN.046. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA RABDOMIOSARCOMA V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN  
PARA RABDOMIOSARCOMA****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de genes de fusión para rabdomiosarcoma en tiempo real.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSa): 88299.36
- Código Tarifario INEN: 210770

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para para la Detección de genes de fusión para rabdomiosarcoma, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de geles, análisis y emisión de resultado.
- 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 Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.
- Médico Cirujano de los Departamentos de la Dirección de Cirugía: realiza la toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica) previa coordinación con el Departamento de Patología Clínica.

**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.
  - Tejido fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.
  - Tejido parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido embebido en parafina.

**PNT.DNCC. INEN.046. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA RABDOMIOSARCOMA V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- 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 detección de genes de fusión para rhabdomyosarcoma en pacientes con estudios anatomopatológicos con características de células redondas para confirmar sospecha diagnóstica; en algunos casos puede definir pronóstico y manejo (1).

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

- Balanza pequeña digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Cámara fotográfica digital
- Centrífuga para tubos
- Computadora
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo
- Espectrofotómetro
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg.
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrífuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico

**PNT.DNCC. INEN.046. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA RABDOMIOSARCOMA V.01**

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

- Vortex genie 2 Mixer, color blanco humo.

**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

**7.3 Mobiliario**

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

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

- Agua para PCR x 500 mL
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98% x 2.5 L
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Calibrador para ARN para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Control positivo del gen de fusión pax3/fkhr x 100 uL
- Cuchilla descartable de perfil alto para microtomo de rotación x 50
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Gen mrpl19
- Gen pax3-fkhr
- Guante para examen descartable talla m
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Kit para la extracción de ARN total de tejido formolado y/o parafinado x 50 reacciones
- Mandilón descartable talla M
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas

**PNT.DNCC. INEN.046. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA RABDOMIOSARCOMA V.01**

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

- Placa de 96 pocillos color blanco para equipo para prueba PCR en tiempo real cobas 4800 x 50
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Primer fkh r: 5'-tgaactgtctgttagggacag-3' x 1000 determinaciones
- Primer mrpl19 f: 5'-ggaagaggacttgagctact-3' x 1000 determinaciones
- Primer mrpl19 r: 5'-tcctggaccgaggattat-3' x 1000 determinaciones
- Primer pax3 f: 5-cagacagcagctctgcctac-3 x 1000 determinaciones
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Solución premezclada para pcr tiempo real concentración 2x x 200 determinaciones
- Sonda mrpl19 fam-tcgaaggacaagggtgtcgagattg-tamra x 1000 determinaciones
- Sonda pax3/fkhr fam-cctctcacctcag/aattcaattgtca-tamra x 1000 determinaciones
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Tips con filtro 1000 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Tóner de Impresión para Xerox cod. ref. 106R02318 Negro
- Tubo de polipropileno 200 uL para pcr con tapa plana x 1000
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 mL x 1000
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL x 500
- Tubo de polipropileno para pcr de 200 uL con tapa x 1000
- Xilol q.p. x 4 L

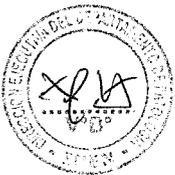
**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

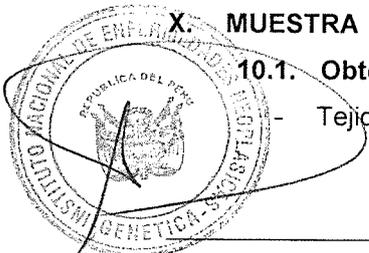
- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. Obtención de la muestra:**

- Tejido fresco: se realiza por los Departamentos de Cirugía.



**PNT.DNCC. INEN.046. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA RABDOMIOSARCOMA V.01**

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

- Tejido embebido en parafina (TEEP): se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

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

**10.3. Recipiente:**

- Tejido fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina

**10.4. Conservación y manejo:**

- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente

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

Basado en metodología descrita por Tracey 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:**

Tejido fresco: muestra tomada en proceso realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

Tejido embebido en parafina (TEEP): obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**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 al proceso, en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar y disposición de inicio de trabajo, en el caso de tejido fresco pasa directamente a la siguiente actividad; en el caso de TEEP, se realiza posterior a la revisión por el médico patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina e ingresa al proceso de desparafinación por medio de batería de alcoholes (Xilol).

**11.4 Extracción y cuantificación de ARN:**

Por medio del kit para la extracción de ARN total de tejido formolado y/o parafinado y por metodología de centrifugación, lavados y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular.

Tejido fresco: se utiliza un tissue lysis buffer y proteinasa K, por medio de metodología de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá pellet de ácido nucleico (ARN).

Cuantificación: 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 100 ng/uL.



**PNT.DNCC. INEN.046. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA RABDOMIOSARCOMA V.01**

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

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

El ARN purificado, obtenido en la actividad previa, es transformado a ADN complementario por medio kit de enzima transcriptasa reversa y un ciclo de activación en el termociclador.

**11.6 Primera amplificación:**

Se utiliza la solución premezclada para PCR tiempo real que contiene la master mix necesaria para el proceso (que incluye la enzima polimerasa para la amplificación) y la sonda taqman, además de los primers de los genes de fusión PAX/FKHR, PAX7/FKHR y gen de referencia MRLP19, 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 para definir la presencia de la expresión génica, se considera el umbral de amplificación (Ct) de 35 ciclos; si la curva amplifica con un Ct < 35 ciclos se considera positivo para la presencia de la fusión génica. El resultado final se expresa como detectado o no detectado según bibliografía (2) y protocolos internos.

**11.8 Elaboración y entrega de resultado:**

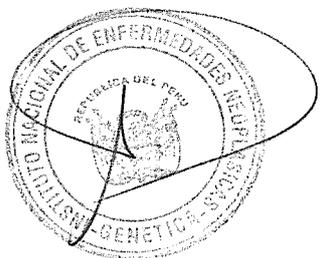
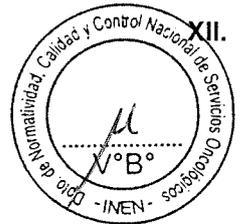
El biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de otros exámenes auxiliares por el médico genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Meleth, Sreeletha, Nedra Whitehead, Tammeka Swinson Evans, and Linda Lux. Genetic Testing in the Diagnosis of Ewing Sarcoma. Agency for Healthcare Research and Quality (US), 2013.
2. Tracey BL, Cheryl MC, Philip SB. Differentiating Ewing's sarcoma from other round blue cell tumors using a RT-PCR translocation panel con formalin-fixed paraffin-embedded tissues, Modern Pathology (2007) 20, 397-404.

**XIII. ANEXO**

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



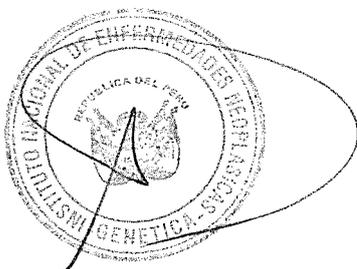
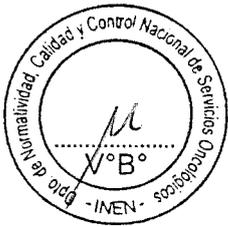
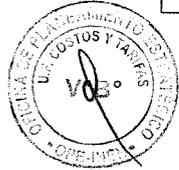


**PNT.DNCC. INEN.046. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA RABDOMIOSARCOMA V.01**

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

**ANEXO N° 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	1-7	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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN.047. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA SINOVIAL V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN  
PARA SARCOMA SINOVIAL****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de genes de fusión para sarcoma sinovial por PCR convencional.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.37
- Código Tarifario INEN: 210771

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de detección de genes de fusión para sarcoma sinovial, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de geles, análisis y emisión de resultado.
- 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 Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.
- Médico Cirujano de los Departamentos de la Dirección de Cirugía: realiza la toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica) previa coordinación con el Departamento de Patología Clínica.

**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.
- Tejido fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.
- Tejido parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido embebido en parafina.

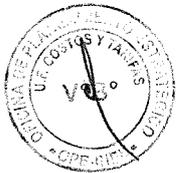
**PNT.DNCC. INEN.047. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA SINOVIAL V.01**

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

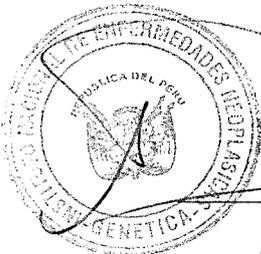
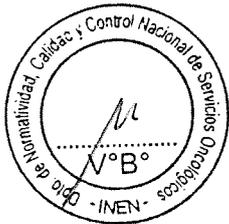
- Pellet: Pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucleico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- Ácido Desoxirribonucleico (ADN): 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 detección de genes de fusión para sarcoma sinovial en pacientes con estudios anatomopatológicos con características de células redondas para confirmar sospecha diagnóstica; en algunos casos puede definir pronóstico y manejo (1).

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

- Balanza pequeña digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Cámara fotográfica digital
- Centrífuga para tubos
- Computadora
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24 000 Btu tipo piso techo.
- Espectrofotómetro
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg.
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrífuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.



**PNT.DNCC. INEN.047. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA SINOVIAL V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**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

**7.3 Mobiliario**

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

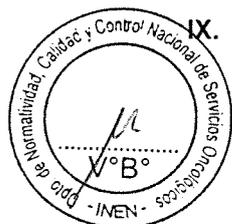
**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:**

- Agua para PCR x 500 mL
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98° x 2.5 L
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Buffer tris acetato - EDTA 10x x 1 L
- Calibrador para arn para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000x x 200 uL
- Cuchilla descartable de perfil alto para microtomo de rotación x 50
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Enzima transcriptasa reversa x 200 determinaciones
- Guante para examen descartable talla M
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Kit enzima hot star taq polimerasa x 250 U con buffer y mgc12
- Kit para la extracción de arn total de tejido formolado y/o parafinado x 50 reacciones
- Mandilón descartable talla M
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 uL
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas

**PNT.DNCC. INEN.047. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA SINOVIAL V.01**

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

- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 uL - 20 uL x 96 U
- Syt-ssx1, syt-ssx2:
  - o Primer syt f: 5'-ccagcagaggccttatggata-3' x 1000 determinaciones
  - o Primer ssx2 r: 5'-gcacttctccgaatcatttct-3' x 1000 determinaciones
  - o Primer ssx1 r: 5'-acactccttcgaatcatttgcg-3' x 1000 determinaciones
  - o Control positivo del gen de fusión syt/ssx1 x 100 uL
  - o Control positivo del gen de fusión syt/ssx2 x 100 uL
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Tips 0.5 uL -10 uL x 500 U
- Tips con filtro 1000 uL x 96
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Tóner de Impresión para Xerox cod. ref. 106R02318 Negro
- Tubo de polipropileno 200 uL para pcr con tapa plana x 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 mL x 1000 U
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL x 500 U
- Xilol q.p. x 1 L

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

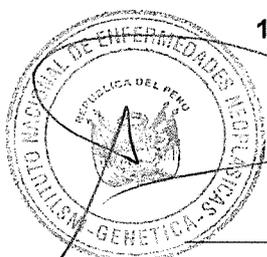
- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. Obtención de la muestra:**

- Tejido fresco: se realiza por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

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



**PNT.DNCC. INEN.047. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA SINOVIAL V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**10.3. Recipiente:**

- Tejido fresco: rasco estéril y cloruro de sodio 9/1000.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente.

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

Basado en metodología descrita por tracey 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:**

Tejido fresco: muestra obtenida por proceso realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

Tejido embebido en parafina (TEEP): obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**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 al proceso, en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar y disposición de inicio de trabajo, en el caso de tejido fresco pasa directamente a la siguiente actividad; en el caso de TEEP, se realiza posterior a la revisión por el médico patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina e ingresa al proceso de Desparafinación por medio de batería de alcoholes (Xilol).

**11.4 Extracción y cuantificación de ARN:**

Por medio del kit para la extracción de ARN total de tejido formolado y/o parafinado y por metodología de centrifugación, lavados y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con agua de grado molecular.

Tejido fresco: se utiliza un tissue lysis buffer y proteinasa K, por medio de metodología de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá pellet de ácido nucleico (ARN).

Cuantificación: 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 100 ng/ul.

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

El ARN purificado, obtenido en la actividad previa, son transformados a ADN complementario por medio kit de enzima transcriptasa reversa y un ciclo de activación en el termociclador.

**11.6 Primera amplificación:**

Se usan primers específicos para los genes de fusión SYT/SSX1 y SYT/SSX2 y enzima polimerasa para la amplificación (enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos



# PNT.DNCC. INEN.047. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA SINOVIAL V.01

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

de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de las regiones específicas.

### 11.7 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 los genes estudiados: SYT/SSX1: 77 pb, SYT/SSX2: 77 pb) según bibliografía (2) y protocolos internos.

### 11.8 Elaboración y entrega de resultado:

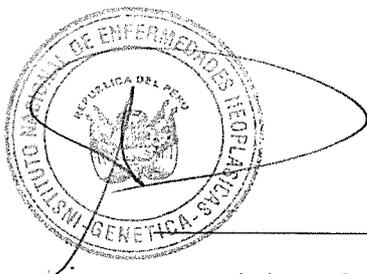
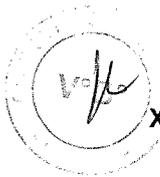
El biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de otros exámenes auxiliares por el médico genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Meleth, Sreeletha, Nedra Whitehead, Tammeka Swinson Evans, and Linda Lux. Genetic Testing in the Diagnosis of Ewing Sarcoma. Agency for Healthcare Research and Quality (US), 2013.
2. Tracey BL, Cheryl MC, Philip SB. Differentiating Ewing's sarcoma from other round blue cell tumors using a RT-PCR translocation panel con formalin-fixed paraffin-embedded tissues, Modern Pathology (2007) 20, 397 -404.

## XIII. ANEXO

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



**PNT.DNCC. INEN.048. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MUTACION DEL GEN BRAF V600E V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACIÓN DEL GEN BRAF V600E****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Mutación del gen BRAF V600E por PCR en tiempo real IVD.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81210
- Código Tarifario INEN: 210742

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Mutación del gen BRAF V600E, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de geles, análisis y emisión de resultado.
- 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 patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.
- Médico cirujano de los Departamentos de la Dirección de Cirugía: realiza la toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica) previa coordinación con el Departamento de Patología Clínica.

**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.
- 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.

Tejido Fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.

Solución Salina: Solución esterilizada de agua y cloruro sódico que es isotónica con la sangre, se usa como medio de transporte de tejido fresco.

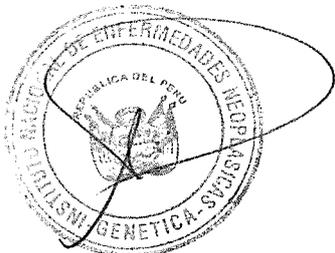
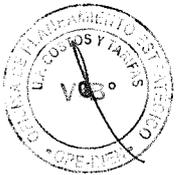


**PNT.DNCC. INEN.047. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN PARA SARCOMA SINOVIAL V.01**

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

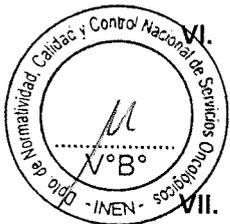
**ANEXO N° 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1-7	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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN.048. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MUTACION DEL GEN BRAF V600E V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

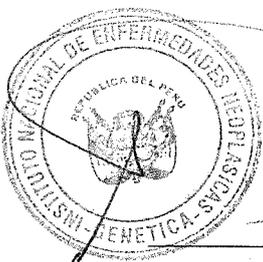
- Tejido Parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido embebido en parafina.
- Pellet: Pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucléico: 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.
- PCR en Tiempo Real por KIT IVD: Conjunto de componentes reactivos que se empaquetan juntos y se destinan a ser utilizados para realizar un examen IVD específico. Incluyen: calibradores y/o materiales de control como así otros artículos y materiales.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de la mutación V600E del gen BRAF para determinación de pronóstico en cáncer de tiroides y cáncer de colon, así como el uso de terapias target como los inhibidores BRAF y otros en melanoma, cáncer de colon, etc. (1).

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

- Balanza pequeña digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Cámara fotográfica digital
- Centrífuga para tubos
- Computadora
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo.
- Espectrofotómetro
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras



**PNT.DNCC. INEN.048. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MUTACION DEL GEN BRAF V600E V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Microcentrífuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Vortex genie 2 Mixer, color blanco humo.

**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

**7.3 Mobiliario**

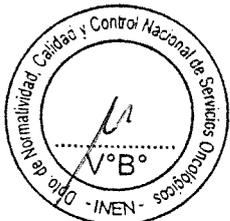
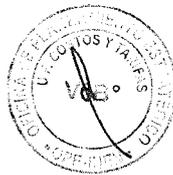
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Estante de melanina
- Mesa de metal
- Módulo de melanina para computadora
- Módulo para computadora enchapado en melamine
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Silla fija de metal con brazos
- Silla giratoria de metal tipo cajero

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

- Aguja hipodérmica descartable N° 25 g x 5/8 in
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Alcohol etílico (etanol) 98% x 2.5 L
- Alcohol etílico (etanol) 98% x 2.5 L
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Cuchilla descartable de perfil alto para microtomo de rotación x 50
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Gorro descartable de enfermera

**PNT.DNCC. INEN.048. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MUTACION DEL GEN BRAF V600E V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para dama talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 ml
- Kit de extracción de ácidos nucleicos a partir de muestra incluida en parafina x 24 determinaciones
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Papel toalla x 300 m
- Placa transparente de 96 pocillos para equipo para prueba pcr en tiempo real lightcycler 480 x 50 negro
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Sistema de detección de mutaciones del gen braf x 24 determinaciones
- Tips con filtro 1000 uL x 96 U
- Tips con filtro 200 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.5 uL - 10 uL (máxima recuperación) x 96 uni/rack
- Tóner de impresión para Xerox cod. ref. 106r02318 negro
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con EDTA
- Xilol q.p. X 1 L

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

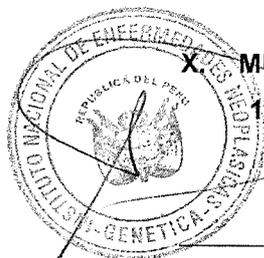
- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. Obtención de la muestra:**

- Tejido fresco: se realiza por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.



**PNT.DNCC. INEN.048. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MUTACION DEL GEN BRAF V600E V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tejido embebido en parafina (TEEP): se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

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

**10.3. Recipiente:**

- Tejido fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente.

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

Basado en metodología descrita en la bibliografía actual (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:**

Tejido fresco: muestra obtenida por proceso realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

Tejido embebido en parafina (TEEP): obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**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 al proceso, en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar y disposición de inicio de trabajo, en el caso de tejido fresco pasa directamente a la siguiente actividad; en el caso de TEEP, se realiza posterior a la revisión por el médico patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina e ingresa al proceso de desparafinación por medio de batería de alcoholes (Xilol).

**11.4 Extracción y cuantificación de ARN:**

Por medio del kit para la extracción de ácidos nucleicos a partir de muestra incluida en parafina y por metodología de centrifugación, lavados y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con 70ul de buffer de elución; luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ADN) cuantificación que se realiza por medio del Calibrador de ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100 ng/ul.

**11.5 Amplificación:**

Se verifica que la cuantificación de ADN sea > de 5 ng/uL para un volumen de 35 uL el cual se procesa por medio del sistema de detección de mutaciones del gen BRAF que contiene la master mix necesaria para el proceso (que incluye la enzima polimerasa para la amplificación) y la sonda taqman, además de los primers de la región específica; el producto final es llevado en una placa transparente de 96



**PNT.DNCC. INEN.048. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACION DEL GEN BRAF V600E V.01**

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

pocillos para equipo para prueba PCR en tiempo real al termociclador en tiempo real donde se irán evidenciando las curvas de detección.

**11.6 Análisis de resultado:**

Se analizan las curvas de amplificación para definir la presencia de la expresión génica, se considera el umbral de amplificación (Ct) de 35 ciclos; si la curva amplifica con un Ct < 35 ciclos se considera positivo para la presencia de la fusión génica. El resultado final se expresa como detectado o no detectado según bibliografía (2) y protocolos internos.

**11.7 Elaboración y entrega de resultado:**

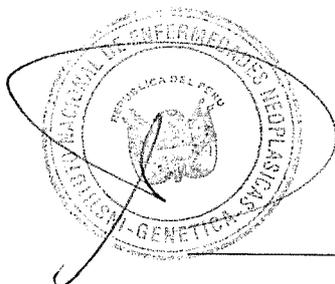
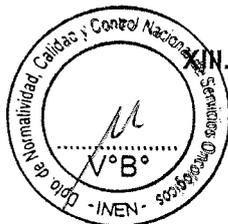
El biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de otros exámenes auxiliares por el médico genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, MacLennan GT, Montironi R. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. *Mod Pathol.* 2018 Jan; 31(1):24–38.
2. Lopez-Rios F, Angulo B, Gomez B, Mair D, Martinez R, Conde E, et al. Comparison of testing methods for the detection of BRAF V600E mutations in malignant melanoma: pre-approval validation study of the companion diagnostic test for vemurafenib. *PLoS One.* 2013; 8(1):e53733.

**XIII. ANEXO**

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



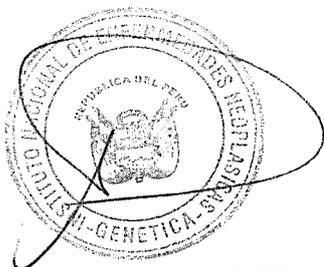
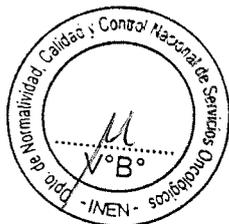


**PNT.DNCC. INEN.048. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACION DEL GEN BRAF V600E V.01**

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

**ANEXO N° 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	1-7	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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC.INEN.050. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACIÓN DEL GEN EGFR (EXONES 18, 19, 20 Y 21) V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACIÓN DEL GEN EGFR  
(EXONES 18, 19, 20 Y 21)****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de mutación del del gen EGFR (exones 18, 19, 20 Y 21) por PCR en tiempo real IVD.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81235
- Código Tarifario INEN: 210743

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Mutación del gen EGFR (exones 18, 19, 20 Y 21), en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de geles, análisis y emisión de resultado.
- 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 Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.
- Médico Cirujano/ Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía: toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica) previa coordinación con el Departamento de Patología Clínica.

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- 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 Nucleico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.

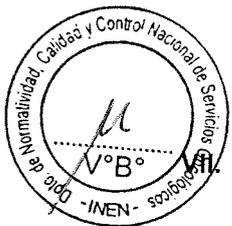
Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.

**PNT.DNCC.INEN.050. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACIÓN DEL GEN EGFR (EXONES 18, 19, 20 Y 21) V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

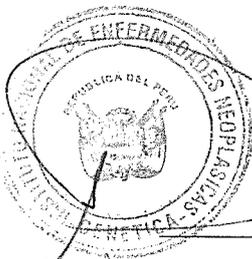
- ADN complementario (cDNA): Es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado.
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido embebido en parafina.
- Estudio Molecular: Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- PCR en tiempo real por KIT IVD: Conjunto de componentes reactivos que se empaquetan juntos y se destinan a ser utilizados para realizar un examen IVD específico. Incluyen: calibradores y/o materiales de control como así otros artículos y materiales.
- Pellet: Pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- 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.
- Solución Salina: Solución esterilizada de agua y cloruro sódico que es isotónica con la sangre, se usa como medio de transporte de tejido fresco.
- Tejido fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.
- Tejido Parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de mutaciones del gen EGFR (exones 18, 19, 20, 21: delección exón 19, L858R, T790M, G719A, G719S, L861Q entre otros) para determinación de pronóstico y como factor predictivo de respuesta al tratamiento con inhibidores de la tirosinquinasa (TKI) en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas y otras neoplasias (1)(2).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos
- Computadora
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo.
- Espectrofotómetro
- Impresora de código de barras térmicas 102mm/seg.
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrífuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico



**PNT.DNCC.INEN.050. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACIÓN DEL GEN EGFR (EXONES 18, 19, 20 Y 21) V. 01**

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

- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.

**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

**7.3 Mobiliario**

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

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

- Aguja hipodérmica descartable N° 25 g x 5/8 in
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Alcohol etílico (etanol) 98% x 2.5 L
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Cuchilla descartable de perfil alto para microtomo de rotación x 50
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Gorro descartable de enfermera
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril para caballero manga larga talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Kit de extracción de ácidos nucleicos a partir de muestra incluida en parafina x 24 determinaciones
- Lentes protectores de policarbonato

**PNT.DNCC.INEN.050. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACIÓN DEL GEN EGFR (EXONES 18, 19, 20 Y 21) V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Papel toalla x 300 m
- Placa transparente de 96 pocillos para equipo para prueba PCR en tiempo real lightcycler 480 x 50 negro
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Sistema de detección de mutaciones del gen EGFR x 24 determinaciones
- Tips con filtro 1000 uL x 96 U
- Tips con filtro 200 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.5 ul - 10 uL (máxima recuperación) x 96 uni/rack
- Tóner de impresión para xerox cod. Ref. 106r02318 negro
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Xilol q.p. x 1 L

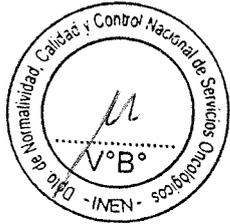
**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. Obtención de la muestra:**

- Tejido fresco: se realiza por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos Nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN).

**10.3. Recipiente:**

- Tejido fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.



**PNT.DNCC.INEN.050. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACIÓN DEL GEN EGFR (EXONES 18, 19, 20 Y 21) V. 01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**10.4. Conservación y manejo:**

- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente.

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

Basado en metodología descrita por bibliografía actual (3) 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:**

Tejido fresco: muestra obtenida por proceso realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

Tejido embebido en parafina (TEEP): obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**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 al proceso, en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar y disposición de inicio de trabajo, en el caso de tejido fresco pasa directamente a la siguiente actividad; en el caso de TEEP, se realiza posterior a la revisión por el médico patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina e ingresa al proceso de desparafinación por medio de batería de alcoholes (Xilol).

**11.4 Extracción y cuantificación de ADN:**

Por medio del kit de extracción de ácidos nucleicos a partir de muestra incluida en parafina y por metodología de centrifugación, lavados y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con 70  $\mu$ l de buffer de elución; luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ADN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100 ng/ $\mu$ l.

**11.5 Amplificación:**

Se verifica que la cuantificación de ADN sea  $>$  de 2 ng/ $\mu$ l para un volumen de 90  $\mu$ l el cual se procesa por medio del sistema de detección de mutaciones del gen EGFR que contiene la master mix necesaria para el proceso (que incluye la enzima polimerasa para la amplificación) y la sonda taqman, además de los primers de la región específica; el producto final es llevado en una placa transparente de 96 pocillos para equipo para prueba PCR en tiempo real al termociclador en tiempo real donde se irán evidenciando las curvas de detección.

**11.6 Análisis de resultado:**

Se analizan las curvas de amplificación para definir la presencia de la expresión génica, se considera el umbral de amplificación (Ct) de 35 ciclos; si la curva amplifica con un Ct  $<$  35 ciclos se considera positivo para la presencia de la fusión génica. El resultado final se expresa como detectado o no detectado según bibliografía (3) y protocolos internos.



**PNT.DNCC.INEN.050. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACIÓN DEL GEN EGFR (EXONES 18, 19, 20 Y 21) V. 01**

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

**11.7 Elaboración y entrega de Resultado:**

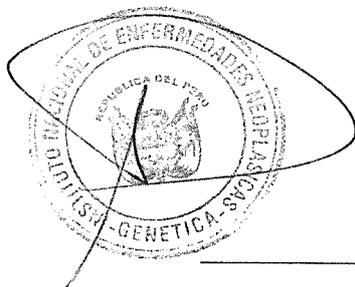
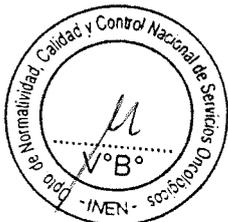
El biólogo encargado de la prueba, elaborará el resultado en el SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos, resultados previos y de otros exámenes auxiliares por el médico genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el SISINEN.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Zhu C-Q, da Cunha Santos G, Ding K, Sakurada A, Cutz J-C, Liu N, et al. Role of KRAS and EGFR As Biomarkers of Response to Erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. J Clin Oncol. 2008;26(26):4268–75.
2. Charlton M E, Karlitz JJ, Schlichting JA, Chen VW, Lynch CF. Factors associated with guideline-recommended KRAS testing in colorectal cancer patients: A population-based study. Am J Clin Oncol. 2017 Oct; 40(5):498–506.
3. Sharma A, Zhang G, Aslam S, Yu K, Chee M, Palma JF. Novel Approach for Clinical Validation of the cobas KRAS Mutation Test in Advanced Colorectal Cancer. Mol Diagn Ther. 2016; 20(3):231–40.

**XIII. ANEXO**

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

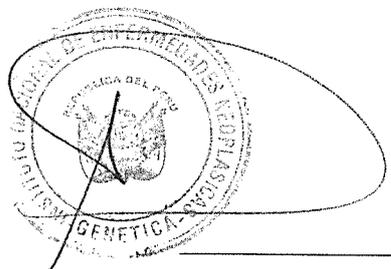
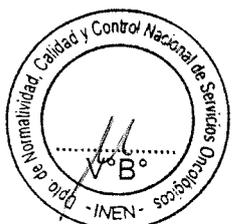
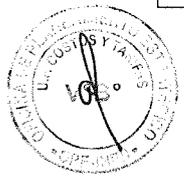




**PNT.DNCC.INEN.050. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACIÓN DEL GEN EGFR (EXONES 18, 19, 20 Y 21) V. 01**  
 Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
 Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

**ANEXO N° 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	1-7	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INE/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN.049. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MUTACION DEL GEN KRAS (CODONES 12, 13, 61) V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACIÓN DEL GEN KRAS  
(CODONES 12, 13, 61)****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de mutación del gen KRAS (codones 12, 13, 61) por PCR en tiempo real IVD.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSa): 81275
- Código Tarifario INEN: 210744

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Mutación del gen KRAS (codones 12, 13, 61), en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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:

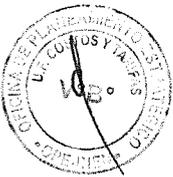
- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de geles, análisis y emisión de resultado.
- 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 Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: revisión de láminas para realizar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.
- Médico Cirujano/ Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía: realiza la toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica) previa coordinación con el Departamento de Patología Clínica.

**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.
- Tejido fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.
- Solución Salina: Solución esterilizada de agua y cloruro sódico que es isotónica con la sangre, se usa como medio de transporte de tejido fresco.
- Tejido Parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural

**PNT.DNCC. INEN.049. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MUTACION DEL GEN KRAS (CODONES 12, 13, 61) V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

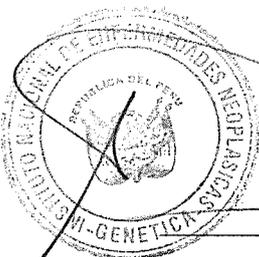
- Desparafinación: Eliminación de la parafina de un tejido embebido en parafina.
- Pellet: Pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- Ácido Nucléico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra 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.
- PCR en Tiempo Real por KIT IVD: Conjunto de componentes reactivos que se empaquetan juntos y se destinan a ser utilizados para realizar un examen IVD específico. Incluyen: calibradores y/o materiales de control como así otros artículos y materiales.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de mutaciones del gen KRAS (codones 12, 13 y 61) para la determinación de pronóstico y como predictor de respuesta al uso de terapias target como los inhibidores del EGFR en diferentes tipos de cáncer, especialmente en cáncer colorrectal (1) (2).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos
- Computadora
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo.
- Espectrofotómetro
- Impresora de código de barras térmicas 102mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras
- Microcentrífuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico



**PNT.DNCC. INEN.049. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MUTACION DEL GEN KRAS (CODONES 12, 13, 61) V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Teclado keyboard con puerto USB
- Unidad central de proceso-CPU de 3.1GHz
- Vortex genie 2 Mixer, color blanco humo.

**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

**7.3 Mobiliario**

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

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

- Aguja hipodérmica descartable n° 25 g x 5/8 in
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Alcohol etílico (etanol) 98% x 2.5 L
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 ml
- Cuchilla descartable de perfil alto para microtomo de rotación x 50 U
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Gorro descartable de enfermera
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S

**PNT.DNCC. INEN.049. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MUTACION DEL GEN KRAS (CODONES 12, 13, 61) V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Kit de extracción de ácidos nucleicos a partir de muestra incluida en parafina x 24 determinaciones
- Lentes protectores de policarbonato
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Papel toalla x 300 m
- Placa transparente de 96 pocillos para equipo para prueba PCR en tiempo real lightcycler 480 x 50 negro
- Plumón de tinta indeleble punta fina
- Sistema de detección de mutaciones del gen kras x 24 determinaciones
- Tips con filtro 1000 uL x 96 U
- Tips con filtro 200 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.5 uL - 10 uL (máxima recuperación) x 96 uni/rack
- Tóner de impresión para xerox cod. Ref. 106r02318 negro
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con edta
- Xilol q.p. x 1 L

**SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

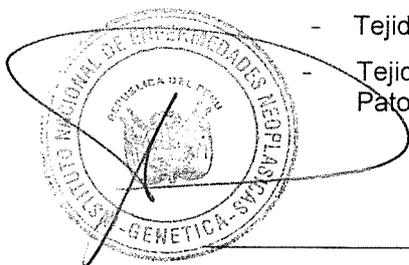
- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA****10.1. Obtención de la muestra:**

- Tejido fresco: se realiza por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): se realiza en el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.



**PNT.DNCC. INEN.049. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
MUTACION DEL GEN KRAS (CODONES 12, 13, 61) V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos Nucleicos: Ácido Ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico complementario (cADN).

**10.3. Recipiente:**

- Tejido fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente.

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

Basado en metodología descrita por bibliografía actual (3) 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:**

Tejido fresco: muestra obtenida por proceso realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

Tejido embebido en parafina (TEEP): obtiene del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia.

**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:**

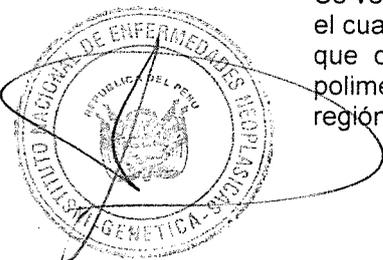
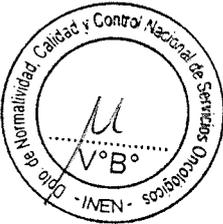
Proceso pre analítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas al proceso, en un ambiente con bioseguridad tipo II, limpieza de cámara de flujo laminar y disposición de inicio de trabajo, en el caso de tejido fresco pasa directamente a la siguiente actividad; en el caso de TEEP, se realiza posterior a la revisión por el médico patólogo, que define la marcación de lámina y elección de bloque de parafina e ingresa al proceso de Desparafinación por medio de batería de alcoholes (Xilol).

**11.4 Extracción y cuantificación de ADN:**

Por medio del kit de extracción de ácidos nucleicos a partir de muestra incluida en parafina y por metodología de centrifugación, lavados y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ARN), el cual será resuspendido con 70 uL de buffer de elución; luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ADN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador de ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 100 ng/uL.

**11.5 Amplificación:**

Se verifica que la cuantificación de ADN sea > de 2 ng/uL para un volumen de 90 uL el cual se procesa por medio del sistema de detección de mutaciones del gen KRAS que contiene la master mix necesaria para el proceso (que incluye la enzima polimerasa para la amplificación) y la sonda taqman, además de los primers de la región específica; el producto final es llevado en una placa transparente de 96





**PNT.DNCC. INEN.049. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACION DEL GEN KRAS (CODONES 12, 13, 61) V.01**  
 Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
 Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

pocillos para equipo para prueba PCR en tiempo real al termociclador en tiempo real donde se irán evidenciando las curvas de detección.

**11.6 Análisis de resultado:**

Se analizan las curvas de amplificación para definir la presencia de la expresión génica, se considera el umbral de amplificación (Ct) de 35 ciclos; si la curva amplifica con un Ct < 35 ciclos se consideran positivo para la presencia de la fusión génica. El resultado final se expresa como detectado o no detectado según bibliografía (2) y protocolos internos.

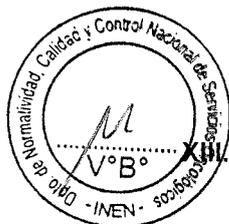
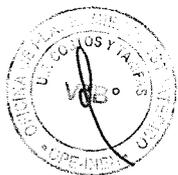
**11.7 Elaboración y entrega de resultado:**

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.



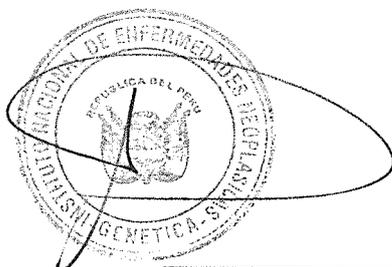
**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Zhu C-Q, da Cunha Santos G, Ding K, Sakurada A, Cutz J-C, Liu N, et al. Role of KRAS and EGFR As Biomarkers of Response to Erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. J Clin Oncol. 2008; 26(26):4268–75.
2. Charlton ME, Karlitz JJ, Schlichting JA, Chen VW, Lynch CF. Factors associated with guideline-recommended KRAS testing in colorectal cancer patients: A population-based study. Am J Clin Oncol. 2017 Oct; 40(5):498–506.
3. Sharma A, Zhang G, Aslam S, Yu K, Chee M, Palma JF. Novel Approach for Clinical Validation of the cobas KRAS Mutation Test in Advanced Colorectal Cancer. Mol Diagn Ther. 2016; 20 (3):231–40.



**XIII. ANEXO**

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

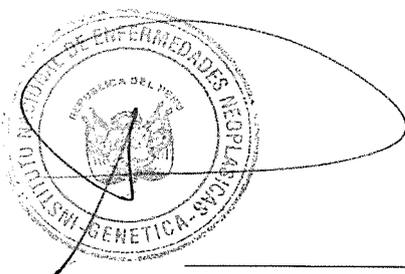
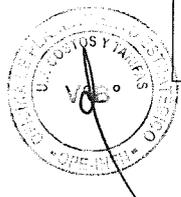




**PNT.DNCC. INEN.049. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE MUTACION DEL GEN KRAS (CODONES 12, 13, 61) V.01**  
 Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
 Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

**ANEXO N° 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	1-7	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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC.INEN.051. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LOS EXONES 8 Y 17 DEL GEN C-KIT V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LOS EXONES 8 Y 17 DEL GEN C-KIT****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de mutaciones de los exones 8 y 17 del gen C-KIT por secuenciamiento sanger y análisis de fragmentos.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.24
- Código Tarifario INEN: 210763

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de detección de mutaciones de los exones 8 y 17 del gen C-KIT, en el área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular, 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 en el SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de geles, 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.
- 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.
  - 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.

**PNT.DNCC.INEN.051. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LOS EXONES 8 Y 17 DEL GEN C-KIT V.01**

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

- 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
- Ácido Nucléico: 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.
- 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.
- Análisis de Fragmentos: Análisis del tamaño y cantidad de fragmentos de DNA amplificados por PCR y marcados con fluorescencia.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

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

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

- Analizador genético automatizado
- Balanza pequeña digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de flujo laminar, clase II
- Cámara fotográfica digital
- Centrífuga para tubos
- Computadora
- Congeladora de metal, color plomo
- CPU intel core i7-477
- Equipo aire acondicionado tipo doméstico de 24000 Btu tipo piso techo.
- Espectrofotómetro
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Impresora de código de barras térmicas 102 mm/seg
- Impresora láser blanco y negro 52 Ppm
- Lectora de código de barras

**PNT.DNCC.INEN.051. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LOS EXONES 8 Y 17 DEL GEN C-KIT V.01**

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

- Microcentrifuga refrigerada
- Microtomo de rotación
- Monitor plano de 20 In
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Teclado alfanumérico
- Transiluminador
- Vortex genie 2 mixer, color blanco humo.

**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

**7.3 Mobiliario**

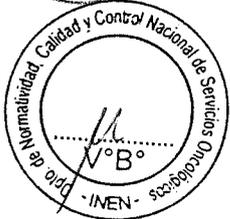
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Estante de melanina
- Mesa de metal
- Módulo de melanina para computadora
- Módulo para computadora enchapado en melamine
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Silla fija de metal con brazos
- Silla giratoria de metal tipo cajero

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

- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 U
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m

**PNT.DNCC.INEN.051. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCION DE MUTACIONES EN LOS EXONES 8 Y 17 DEL GEN C-KIT V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Formamida hidi desionizada ultrapura para secuenciamiento big dye x 25 mL
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Guante para examen descartable talla M
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator v 3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones
- Lentes protectores de policarbonato
- Mandilón descartable talla M
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Mascarilla descartable tipo N-95
- Microplaca de polipropileno 96 pocillos para analizador genético abi 3500
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Papel toalla x 300 m
- Polímero pop 7 para analizador genético 3500 sachet para 384 muestras
- Primer c-kit exón 17 f: 5'- atggtttctctctcctcc-3' x 1000 determinaciones
- Primer c-kit exón 17 r: 5'- tacattatgaaaatcacagg-3' x 1000 determinaciones
- Primer ckit-e8f 5'-gcagcctcaggaaggtgta-3' 50 n
- Primer kit ex8f 5'-fam-gctgaggtttccagcactc-3' x 50 nmol
- Puntera (tips) estéril con filtro 2 µl - 20 µl x 96 U
- Reactivo para condicionamiento analizador genético 3500
- Septa contenedor buffer catodo para analizador genético 3500 x 10 U
- Septa de placa para analizador genético 3500 de 96 pocillos x 20 U
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 U
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 U
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Tips con filtro 1000 uL x 96 U
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 U



**PNT.DNCC.INEN.051. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LOS EXONES 8 Y 17 DEL GEN C-KIT V.01**

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

- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 U
- Tóner de impresión para xerox cod. ref. 106r02318 negro
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500
- Tubo de polipropileno para PCR de 200 µl con tapa x 1000
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con EDTA

**IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS****9.1. Servicios Técnicos:**

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos Biomédicos
- Equipos de Aire Acondicionado
- Equipos Eléctricos

**9.2. Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**MUESTRA****10.1. 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.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido Desoxirribonucleico (ADN).

**10.3. Recipiente:**

- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula Ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.

**10.4. 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 24 hrs.; tiempos mayores a este periodo se sugiere conservar entre 2 - 8°C.

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

Basado en metodología descrita por bibliografía actual (2) y protocolos propios del área de Biología Molecular del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

**PNT.DNCC.INEN.051. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCION DE MUTACIONES EN LOS EXONES 8 Y 17 DEL GEN C-KIT V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.1 Toma de muestra:**

Sangre venosa: realizada por personal técnico designado en el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica.

Médula ósea: realizada por el Médico Oncólogo del Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica o por el Médico Oncólogo Pediatra del Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.

**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 de ADN y cuantificación:**

Se realiza a partir de 200 uL de sangre total y o medula ósea por medio del kit de extracción de ADN genómico y el método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico (ADN) cuantificación que se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro, se espera que el valor este por encima de 600 ng/UI.

**11.5 Amplificación por PCR:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para los exones 8 y 17 del gen C-KIT y por medio de uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima Taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad) 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.

**11.6 Secuenciamiento y análisis de fragmentos:**

Análisis de fragmentos del exón 8: los productos de la amplificación confirmados son aforados con Formamida y son llevados a una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, este debe contener la septa de placa y la septa de contenedor ánodo buffer con las soluciones tampón buffer ánodo y cátodo, así como los capilares deben contener el polímero pop 7 y los estándares de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 pb a 600 pb marcados con fluorescencia; luego se da inicio a la electroforesis capilar según el programa específico para el análisis de fragmentos determinado.

Secuenciamiento del exón 17: los productos de la amplificación confirmados pasan al proceso de purificación por medio del kit de Purificación de productos de PCR por centrifugación y lavados; el producto final debe ser cuantificado para determinar adecuada cantidad de ADN para la reacción de secuenciamiento. Los productos de la purificación son procesados con el Kit de secuenciamiento BigDye Terminator y primers específicos para la región del exón 17 del gen C-KIT, los productos obtenidos son llevados al termociclador para paso por medio de ciclos de calor. Los productos de la reacción de secuenciamiento deben de procesarse con el kit para

**PNT.DNCC.INEN.051. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCION DE MUTACIONES EN LOS EXONES 8 Y 17 DEL GEN C-KIT V.01**

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

Purificación de productos de reacción de secuenciamiento y el producto obtenido se centrifuga y se recupera el sobrenadante (vol. 90 – 100 uL) los cuales son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, para el secuenciamiento genético, este debe contener la septa de placa y la septa de contenedor ánodo buffer con las soluciones tampón buffer Ánodo y Cátodo, así como los capilares deben contener el Polímero Pop 7; luego se da inicio a la electroforesis capilar según el programa específico para el gen estudiado.

**11.7 Análisis de resultado:**

Se realiza posterior a la corrida en el analizador genético del cual se exportan las secuencias genéticas en formato FASTA en el programa GeneMapper® y se realiza el análisis de los electroferogramas, considerando los controles de calidad para definir si la corrida es adecuada, así como los estándares de tamaño de los fragmentos; así como el patrón molde en caso de la secuenciación 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.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Park SH, Lee HJ, Kim I-S, Kang J-E, Lee EY, Kim H-J, et al. Incidences and Prognostic Impact of c-KIT, WT1, CEBPA, and CBL Mutations, and Mutations Associated With Epigenetic Modification in Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: A Multicenter Study in a Korean Population. Ann Lab Med. 2015 May; 35(3):288–97.
2. Park SH, Chi H-S, Min S-K, Park BG, Jang S, Park C-J. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor acute myeloid leukemia. Leuk Res. 2011 Oct; 35(10):1376–83.

**XIII. ANEXO**

– Anexo N° 1: Control de cambios y mejoras.





**PNT.DNCC.INEN.051. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LOS EXONES 8 Y 17 DEL GEN C-KIT V.01**

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

**ANEXO N° 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).	11/12/2019	M.C. Pamela Mora Alferez

