

REPÚBLICA DEL PERÚ



RESOLUCION JEFATURAL

Lima, 18 de AGOSTO de 2020

VISTOS:

El Informe N° 0256-2020-DICON/INEN, de la Dirección de Control de Cáncer, el Memorando N° 836-2020-OGPP/INEN de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto y el Informe N° 0561-2020-OAJ/INEN de la Oficina de Asesoría Jurídica; y,

CONSIDERANDO:

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

Que, mediante Decreto Supremo N° 001-2007-SA, publicado en el diario oficial El Peruano, el 11 de enero de 2007, se aprobó el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (ROF - INEN), estableciendo la jurisdicción, funciones generales y estructura orgánica del Instituto, así como las funciones de sus diferentes Órganos y Unidades Orgánicas;

Que, mediante Informe N° 042-2020-DICON/INEN, la Dirección de Control de Cáncer, remite el Memorando N° 836-2020-OGPP/INEN, de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto, con el cual alcanza los Informes N° 118- 2020-00-OGPP/INEN elaborado por la Oficina de Organización y el Informe N° 773-2020-OPE-OGPP/INEN elaborado por la Oficina de Planeamiento Estratégico, mediante el cual emiten opinión favorable con respecto a los treinta y dos (32) proyectos de Procedimientos Normalizados de Trabajo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular Tomo III, para la revisión y validación correspondiente;

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

Que, en mérito al sustento técnico de la Oficina de Organización y del Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos, para la aprobación del "Procedimientos Normalizados de Trabajo del Equipo Funcional de



Genética y Biología Molecular Tomo III”, corresponde emitir el acto resolutivo correspondiente para su aprobación;

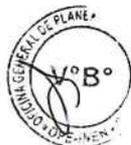


Contando con los vistos buenos de la Sub Jefatura Institucional, de la Gerencia General, de la Dirección de Control del Cáncer, del Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos, de la Oficina General de Planeamiento y Presupuesto y de la Oficina de Asesoría Jurídica;



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

**SE RESUELVE:**



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

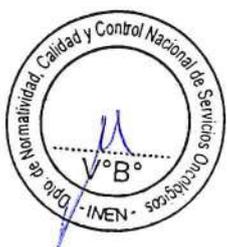
- “Procedimientos Normalizados de Trabajo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular Tomo III”.

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



**REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y PUBLÍQUESE.**

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

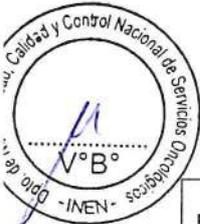




# PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO DEL EQUIPO FUNCIONAL DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

## TOMO III

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



Elaborado por:	- M.C. Analí Pamela Mora Alferez	Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular
Revisado y validado por:	- M. C. Henry Guerra Miller - M. C. Sheyla E. Vilchez Santillán	Departamento de Patología 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 Belzusarri Padilla - M.C. Carmela Barrantes Serrano - Lic. Yoseline Aznarán Isla	Departamento de Normatividad, Calidad y Control Nacional de Servicios Oncológicos





### CONTENIDO

- PNT.DNCC.INEN. 052 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN MOLECULAR DE PAPILOMAVIRUS (PVH) PCR V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 053 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR PCR PARA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 054 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE QUIMERISMO POST-TRANSPLANTE V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 055 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE QUIMERISMO PRE-TRANSPLANTE (RECEPTOR Y DONANTE) V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 056 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANALISIS DE FRAGMENTOS PARA INESTABILIDAD DE MICROSATELITES V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 057 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA V 0.1
- PNT.DNCC.INEN. 058 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACION V617F GEN JAK2 V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 059 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCION POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN BRCA1 V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 060 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCION POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN BRCA2 V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 061 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCION POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN VHL V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 062 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCION POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN CDH1 V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 063 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCION POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN TP53 V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 064 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCION POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MLH1 V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 065 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCION POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MSH2 V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 066 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCION POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL EXON 23 DEL GEN DNMT3 V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 067 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCION DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXON 4 DEL GEN IDH1 V0.1







- PNT.DNCC.INEN. 068 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCION DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXON 4 DEL GEN IDH2 V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 069 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCION POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 9, 11, 13 Y 17 DEL GEN CKIT (GIST u otros) V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 070 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCION POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 12, 14 y 18 DEL GEN PDGFRa (GIST u otros) V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 071 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCION POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL GEN CEBPA V0.1
- PNT.DNCC.INEN 072 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCION DE LA MUTACION FLT3-D835 V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 073 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 074 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL DE DETECCIÓN DE VARIANTES EN GENES ASOCIADOS A SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A CÁNCER POR SECUENCIAMIENTO DE SIGUIENTE GENERACIÓN V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 075 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCION DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 2 Y 3 DEL GEN KRAS (12, 13, 61) V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 076 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCION POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN RET V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 077 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCION DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXON 15 DEL GEN BRAF (mutación V600) V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 078 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL2 V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 079 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL6 V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 080 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) HER2/NEU V0.1
- PNT.DNCC.INEN 081 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) MYC V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 082 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) ALK V0.1
- PNT.DNCC.INEN. 083 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE INESTABILIDAD DE MICROSATELITES V0.1





**PNT.DNCC. INEN. 052 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN MOLECULAR DE PAPILOMAVIRUS (PVH) PCR V.01**

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

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DEL TRABAJO DE DETECCIÓN MOLECULAR DE  
PAPILOMAVIRUS (PVH) PCR****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Detección Molecular de Papilomavirus (PVH) PCR en convencional.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 87621
- Código Tarifario INEN: 210703

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección Molecular de Papilomavirus (PVH) PCR 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 la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo/a del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- 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: toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica).
- Médico Cirujano Oncólogo/Ginecólogo de los Departamentos de Cirugía/Ginecología Oncológica u otras dependencias: toma de muestra de tejido fresco (raspado de mucosa cervical/biopsia/pieza quirúrgica).
- 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, y es responsable de su transmisión hereditaria.

**PNT.DNCC. INEN. 052 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN MOLECULAR DE PAPILOMAVIRUS (PVH) PCR V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología  
Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- **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 Ribonucleico (ARN).** - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y de sintetizar proteínas.
- **Desparafinación.** - Eliminación de la parafina de un tejido fresco.
- **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.
- **Electroforesis.** - Es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en una matriz porosa bajo la inducción de un campo eléctrico.
- **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.
- **Enzima de restricción.** - Proteína con capacidad catalítica para cortar una cadena de ADN en sitios específicos.
- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico.
- **Pellet.** - Pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos.
- **Solución buffer.** - Solución de tampón fosfato salino con pH 7.4 (PBS) se usa como medio de transporte de raspado cervical.
- **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.** - Muestra de tejido biológico obtenida por diferentes métodos: raspado cervical o biopsia.
- **Tejido parafinado (tejido embebido en parafina).** - Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.
- **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.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Prueba utilizada para la identificación de virus de papiloma humano en individuos con criterios de riesgo poblacionales a la infección para definir riesgo o susceptibilidad a cáncer así como en pacientes con diagnóstico de cáncer de cérvix, cáncer de pene, cáncer de ano u otros tipos de cáncer relacionados como el cáncer de cabeza y cuello en los cuales la presencia del virus de papiloma humano está relacionado a la carcinogénesis; por lo tanto puede usarse para confirmar diagnóstico o definir pronóstico.

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos (02)
- Vórtex
- Microcentrífuga refrigerada
- Espectrofotómetro



**PNT.DNCC. INEN. 052 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN MOLECULAR DE PAPILOMAVIRUS (PVH) PCR V.01**

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

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

**7.2 Instrumentales. -**

- Micropipeta volumen variable 0.5 µL – 10 µL
- Micropipeta volumen variable 20 µL – 200 µL
- Micropipeta volumen variable 2 µL – 20 µL
- Micropipeta volumen variable 100 µL – 20 µL

**7.3 Mobiliario. -**

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

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

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (Etanol) 70° X 500 mL
- Algodón hidrófilo X 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 G X 1 In
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm X 9.1 m
- Gel antibacterial para manos X 1 L aprox.
- Papel toalla X 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán X 800 mL
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste

**PNT.DNCC. INEN. 052 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN MOLECULAR DE PAPILOMAVIRUS (PVH) PCR V.01**

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

- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- 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
- Xilol Q.P. X 4 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500 unidades
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL X 1000 unidades
- Tips con filtro 1000 µL X 96 unidades
- Tips estéril con filtro 20 µL - 200 µL X 96 unidades
- Alcohol etílico (etanol) 98% X 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit X 100 determinaciones
- Primer My11: 5' GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG 3' X 50 Nm
- Primer My09: 5' CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC 3' X 50 Nm
- Primer Contadnhr 5'CAACTTCATCCACGTTCCACC 3' X 250 Nmol
- Primer Fluo-Gh20: GAA-GAG-CCA-AGG-ACA-GGT-AC-3' X 250 Nm
- Enzima Taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad X 100 unidades
- Deoxinucleótidos Dntps 4 X 40 Umol en concentración 100 Mm (Kit)
- Marcador de peso molecular (100 Pb 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
- Buffer de carga 6X X 1 mL
- Enzima de restricción Rsa I X 1000 U
- Primer GP5 + TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC X 50 nmol
- Primer GP6 + GAAAATAAACTGTAAATCATATTC X 50 nmol
- Enzima Taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad X 100 unidades
- Deoxinucleótidos Dntps 4 X 40 Umol en concentración 100 Mm (Kit)
- Marcador de peso molecular (100 Pb 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
- Buffer de carga 6X X 1 mL

**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



**PNT.DNCC. INEN. 052 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN MOLECULAR DE PAPILOMAVIRUS (PVH) PCR V.01**

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

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

- Raspado cervical: Dirección de Cirugía, Dirección de Control del Cáncer.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): Es realizado por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología
- Tejido fresco: Es realizado por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN) viral.

**10.3. Recipiente:**

- Raspado cervical: Tubo estéril de 15 cc con solución PBS.
- Tejido fresco: Frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): Bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Raspado cervical: Iniciar el proceso inmediatamente, de no ser posible conservar el tubo entre 4 – 8 °C.
- Tejido fresco: Iniciar el proceso inmediatamente.

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

Basado en metodología descrita por bibliografía actual 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**

- Raspado cervical: Muestra obtenida por procedimiento realizado en sala de procedimientos menores de la Dirección de Cirugía y la Dirección de Control de Cáncer.
- 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): Muestra obtenida 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/la Biólogo/a.

**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).

**PNT.DNCC. INEN. 052 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN MOLECULAR DE PAPILOMAVIRUS (PVH) PCR 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 ADN y cuantificación**

Por medio del kit de extracción de ADN genómico (raspado cervical y tejido fresco) o kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado por metodología de centrifugación, lavados y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN) viral, el cual será resuspendido con 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.

**11.5 Amplificación**

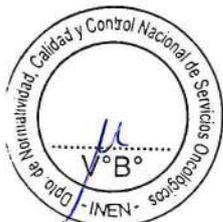
Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio de primers específicos My11 y My09 que amplifican la región L1 del virus PVH y el gen control interno por medio de la enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

**11.6 1° Electroforesis**

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

**11.7 Genotipificación o NESTED PCR**

Por medio de uso de primers específicos GP5 y GP6 se realiza una nueva PCR sobre el producto amplificado anteriormente utilizando la enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad y deoxinucleótidos dNTPs, lo cual aumenta la sensibilidad de la detección de la prueba (PCR - NESTED). La genotipificación se realiza por medio de la enzima de restricción RSA I sobre el producto amplificado. Estos procesos se realizan por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto de la NESTED así como los genotipos definidos.

**11.8 2° Electroforesis**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que analizará los productos de la NESTED y los fragmentos por uso de la enzima de restricción por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

**11.9 Análisis de resultado:**

El análisis del gel realizado posterior a la 1° electroforesis y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia de las bandas de 450 pb que corresponde al genoma del virus PVH y otra de 268 pb que corresponde al gen control interno (B-globina) según bibliografía (3,4) y protocolos internos. La evaluación de la 2° electroforesis de determina el genotipo si se evidencian las bandas entre 149 – 159 pb (PVH-6), 139 – 216 pb (PVH-11), 310 pb (PVH-16), 85-125 – 135 pb (PVH-18), 381 pb (PVH-31), 102 - 236 pb (PVH-33) según bibliografía y protocolos internos.



**PNT.DNCC. INEN. 052 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN MOLECULAR DE PAPILOMAVIRUS (PVH) PCR V.01**

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

**11.10 Elaboración y entrega de resultado**

El/la Biólogo/a encargado de la prueba elaborará el resultado en la plataforma informática SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes auxiliares por el médico genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el sistema SISINEN.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Goodman A. HPV testing as a screen for cervical cancer. BMJ. 30 de junio de 2015;350:h2372.
2. Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H, Miyazaki T. A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. J Clin Med. 27 aug 2018;7(9).
3. Aedo A S, Melo A A, García P, Guzmán G P, Capurro V I, Roa S JC. Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP. Revista médica de Chile. febrero de 2007;135(2):167-73.
4. Daigrepoint J, Cameron JE, Wright KL, Cordell KG, Rosebush MS. Detection of human papillomavirus DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded squamous papillomas of the oral cavity. J Clin Exp Dent. 1 de octubre de 2018;10(10):e979-83.

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC. INEN. 052 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN MOLECULAR DE PAPILOMAVIRUS (PVH) PCR 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).	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN. 053 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR PCR PARA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS 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 POR PCR PARA  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Detección por PCR para *Mycobacterium tuberculosis* en tiempo final.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 87556
- Código Tarifario INEN: 210772

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección por PCR para *Mycobacterium tuberculosis* 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 la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo/a del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de Gel, análisis y emisión de resultado.
- 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

**PNT.DNCC. INEN. 053 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR PCR PARA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS V.01**

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

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- **Estudio molecular.** - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- **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.
- **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, y es responsable de su transmisión hereditaria.
- **Ácido ribonucleico - ARN.** - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de transmisión de genes y de sintetizar proteínas.
- **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.
- **Pellet:** Pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido, en este caso de ácidos nucleicos
- **Electroforesis.** - Es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en una matriz porosa bajo la inducción de un campo eléctrico.
- **Reacción en cadena de la polimerasa - PCR.** - Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico.
- **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

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio que identifica la presencia del *Mycobacterium tuberculosis* en tejido parafinado en casos de duda diagnóstica o confirmación de presencia del bacilo, especialmente en tumores con características granulomatosas que requieran el descarte de la presencia del bacilo como método de diagnóstico diferencial.

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos (02)
- Vórtex
- Microcentrífuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador

**PNT.DNCC. INEN. 053 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR PCR PARA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS V.01**

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

- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor plano de 20 In
- Unidad de central de proceso – CPU de 3.1GHz

**7.2 Instrumentales. –**

- Micropipeta volumen variable 0.5 µL - 10 µL
- Micropipeta volumen variable 20 µL - 200 µL
- Micropipeta volumen variable 2 µL – 20 µL
- Micropipeta volumen variable 100 µL – 20 µL

**7.3 Mobiliario. –**

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

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

- Papel toalla de hojas separadas X 200 Hojas
- Jabon germicida líquido X 800 mL
- Gorro descartable de enfermera
- Guante de Nitrilo Talla M
- Mascarilla descartable N-95
- Tacho de plástico 25 L Aprox.
- Contenedor de plástico de bioseguridad para residuos citostaticos de 7.6 L
- Bolsa de polietileno 72 cm X 51 cm color rojo
- Mandilón descartable Talla M
- Aguja hipodérmica descartable N° 21 G X 1 1/2 In
- Hoja de bisturí descartable N° 22
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500
- Respirador para vapores orgánicos
- Traje de protección tipo mameluco en tela no tejida de polietileno de alta densidad laminada
- Xilol Q.P. X 1 L
- Jeringa descartable de tuberculina 1 mL con aguja 26 G X 1/2 In
- Alcohol Etilico (Etanol) 98.0% X 2.5 L
- Kit de extracción de ADN genómico X 50 determinaciones
- Criobox policarbonato 2 mL para 81 viales

**PNT.DNCC. INEN. 053 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR PCR PARA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS V.01**

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

- Kit de cuantificación de ADN 0.2 Ng - 100 Ng X 100 determinaciones
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit X 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL X 1000
- Enzima Taq ADN Polimerasa Termoactivable de alta fidelidad X 100 U
- Primer Is6110 F 5' CCTGCGAGCGTAGGCGTCCG 3' X 50 Nmol
- Primer Is6110 R 5' CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG 3' X 50 Nmol
- Primer Fluo-Gh20: GAA-GAG-CCA-AGG-ACA-GGT-AC-3' X 250 Nm
- Primer Contadnrh 5'CAACTTCATCCACGTTACC 3' X 250 Nmol
- Dimetilsulfoxido X 100 mL
- Deoxinucleotidos Dntps 4 X 40 Umol en concentracion 100 Mm (Kit)
- Buffer Tae 10X Grado Biología Molecular X 1 L
- Agua para PCR X 500 mL
- Agua destilada 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
- Buffer de carga 6X X 1 mL
- Agarosa grado biología molecular X 500 G

**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 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 desoxirribonucleico bacteriano.

**10.3. Recipiente:**

- Tejido embebido en parafina (TEEP): Bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Los necesarios al bloque de parafina.



**PNT.DNCC. INEN. 053 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR PCR PARA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS 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 bibliografía actual 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 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 Corte de tejido**

Se realizan los cortes del tejido embebido en parafina (TEEP), mínimo de 5 cortes de 1-5micras.

**11.4 Desparafinación de la muestra**

Proceso preanalítico, considera la bioseguridad del proceso e inicia posterior a la revisión por el 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).

**11.5 Aislamiento de ADN**

Por medio del kit de extracción de ADN genómico por metodología de centrifugación, lavados y extracción de sobrenadante se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico (ADN) bacteriano y del hospedero, el cual será resuspendido con buffer de elución.

**11.6 Cuantificación de ADN**

Define cantidad de ácido nucleico (ADN) por medio del calibrador de ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro.

**11.7 Reacción en cadena de polimerasa**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio de primers específicos para la región de IS6110 y el gen control interno por medio de la 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 el producto amplificado de la región específica.



**PNT.DNCC. INEN. 053 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR PCR PARA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS V.01**

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

**11.8 Sistema de Electroforesis horizontal**

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

**11.9 Analisis e interpretación de resultado**

El análisis del gel realizado posterior a la electroforesis y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia de las bandas de 123pb que corresponde a la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* y otra de 268pb que corresponde al gen control interno (B-globina) según bibliografía y protocolos internos.

**11.10 Elaboración y entrega de resultado**

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

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Montenegro S, Delgado C, Pineda S, Reyes C, de la Barra T, Cabezas C, et al. Eficacia del diagnóstico diferencial de tuberculosis mediante reacción de polimerasa en cadena en lesiones granulomatosas de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina. Revista chilena de infectología. 2014 Dec;31(6):676–81.
2. McEvoy CRE, Falmer AA, Gey van Pittius NC, Victor TC, van Helden PD, Warren RM. The role of IS6110 in the evolution of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis (Edinb). 2007 Sep;87(5):393–404.
3. Barcelos D, Franco MF, Leão SC. Effects of tissue handling and processing steps on PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded samples. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2008 Dec;50(6):321–6.

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC. INEN. 053 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR PCR PARA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS 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	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez





**PNT.DNCC. INEN.054 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
QUIMERISMO POST-TRANSPLANTE 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 QUIMERISMO POST-TRANSPLANTE****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de de trabajo de Quimerismo Post-Transplante por metodología de análisis de fragmentos.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81267
- Código Tarifario INEN: 210758

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea el para el procedimiento de Quimerismo Post-Transplante 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/a 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.
- **Punción de médula ósea.** - Prueba médica minimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.

**PNT.DNCC. INEN.054 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
QUIMERISMO POST-TRANSPLANTE 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.
- **Ácido nucleico.** - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- **Ácido desoxirribonucleico - ADN.** - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- **Ácido ribonucleico – ARN.** - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- **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**

Este estudio está indicado para la determinación del porcentaje de ADN del donante en un receptor postrasplante alogénico; sirve para evidenciar si el tejido linfohematopoyético del donante ha sido capaz de implantarse en el organismo del receptor desplazando totalmente al sistema linfohematopoyético del receptor o en coexistencia con este.

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos.
- Microcentrífuga refrigerada
- Vórtex Genie 2 Mixer, color blanco humo.
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Espectrofotómetro
- Termociclador



**PNT.DNCC. INEN.054 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
QUIMERISMO POST-TRANSPLANTE V.01**

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

- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Computadora

**7.2 Instrumentales. –**

- Micropipeta volumen variable 0.5 µL -10 µL
- Micropipeta volumen variable 20 µL -200 µL
- Micropipeta volumen variable 2 µL – 20 µL
- Micropipeta volumen variable 100 µL – 20 µL

**7.3 Mobiliario. –**

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

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

- 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
- Jabon germicida líquido con triclosan 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 MI
- Lentes protectores de policarbonato
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500
- Puntera (Tips) estéril con filtro 2 µL - 20 µL X 96

**PNT.DNCC. INEN.054 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
QUIMERISMO POST-TRANSPLANTE V.01**

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

- Tips con filtro 1000 UI X 96
- Kit de extracción de ADN genómico X 100 determinaciones
- Alcohol etílico (Etanol) 98.0% X 2.5 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL X 1000
- Agua para PCR X 500 mL
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI X 96
- Puntera (Tips) estéril con filtro 10 µl - 100 µl X 96
- Tips estéril con filtro 20 UI - 200 UI X 96
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit X 100 determinaciones
- Agua para PCR X 500 mL
- Kit pre-amplificación de 24 marcadores microsatélites para STR por PCR X 200 determinaciones
- Formamida Hidi desionizada ultrapura para secuenciación Big Dye X 25 mL
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 X 4 Unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 X 4 Unidades
- 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 Unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 X 10 Unidades
- Estandar de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 a 600 Pb marcados con fluorescencia X 800 determinaciones
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético ABI 3500

**X. 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.
- Médula ósea: Se realiza en el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y en



**PNT.DNCC. INEN.054 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
QUIMERISMO POST-TRANSPLANTE V.01**

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

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 previamente 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 de 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/la Biólogo/a.

**11.3 Procesamiento de la muestra**

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 de sangre periférica y/o medula ósea.

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación**

Se realiza a partir de 200 µL de sangre total/médula 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

**PNT.DNCC. INEN.054 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
QUIMERISMO POST-TRANSPLANTE V.01**

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

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/μL.

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

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del Kit Pre-Amplificación de 24 marcadores microsatélites Para STR Por PCR que contiene primers específicos, enzima polimerasa para la amplificación 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 Analisis 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 anodo 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.

**11.7 Analisis 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 según el "plot setting" GlobalFiler identificándose el perfil alélico de la muestra posttransplante (par alélico) para los 24 marcadores de microsatélites (STR). Se compara este perfil con los perfiles pretransplante del receptor y del donante para determinar los pares alélicos informativos completos e informativos parciales; luego se definirá por software informático y según data del "área bajo la curva" la proporción de predominio del perfil del donante sobre el perfil del receptor; reportándose el porcentaje como Quimerismo del donante según bibliografía y protocolos internos.

**11.8 Elaboración y entrega de resultado**

El biólogo encargado de la prueba elaborará el resultado en la plataforma SISINEN consignando el porcentaje de quimerismo de donante y los aparmetros de la corrida; el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico, otros exámenes auxiliares y procede a la validación del caso en la plataforma SISINEN.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Clark JR, Scott SD, Jack AL, Lee H, Mason J, Carter GI, et al. Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): technical recommendations for the use of short tandem repeat (STR) based techniques, on



**PNT.DNCC. INEN.054 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE QUIMERISMO POST-TRANSPLANTE V.01**

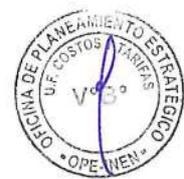
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología  
Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group. Br J Haematol. 2015 Jan;168(1):26–37.

2. Smith A, Nelson RJ. Capillary Electrophoresis of DNA. Curr Protoc Nucleic Acid Chem. 2003;13(1):10.9.1-10.9.16
3. Lion T, Watzinger F, Preuner S, Kreyenberg H, Tilanus M, de Weger R, et al. The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. Leukemia. 2012 Aug;26(8):1821–8.

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC. INEN.054 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE QUIMERISMO POST-TRANSPLANTE 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	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN. 055 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
QUIMERISMO PRE-TRANSPLANTE (RECEPTOR Y DONANTE) 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 QUIMERISMO PRE-TRANSPLANTE  
(RECEPTOR Y DONANTE)****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Quimerismo Pre-transplante (Receptor y Donante) por metodología de análisis de fragmentos.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.27
- Código Tarifario INEN: 210757

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Quimerismo Pre-transplante (Receptor y Donante) 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/a 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/a 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.

**PNT.DNCC. INEN. 055 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
QUIMERISMO PRE-TRANSPLANTE (RECEPTOR Y DONANTE) V.01**

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

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- **Estudio molecular.** - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- **Punción de médula ósea.** - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- **Muestra de sangre periférica.** - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- **Solución anticoagulante.** - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- **Ácido etilendiaminotetraacético – EDTA.** - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- **Ácido nucleico.** - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- **Ácido desoxirribonucleico - ADN.** - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- **Ácido ribonucleico – ARN.** - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- **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**

Este estudio está indicado para la determinación del perfil genético del receptor o del donante en un proceso previo al trasplante alogénico. Es un requisito para el estudio de quimerismo postransplante.

**PNT.DNCC. INEN. 055 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
QUIMERISMO PRE-TRANSPLANTE (RECEPTOR Y DONANTE) V.01**

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

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos.
- Microcentrifuga refrigerada
- Vórtex Genie 2 Mixer, color blanco humo.
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador

**7.2 Instrumentales. –**

- Micropipeta volumen variable 0.5 µL -10 µL
- Micropipeta volumen variable 20 µL -200 µL
- Micropipeta volumen variable 2 µL – 20 µL
- Micropipeta volumen variable 100 µL – 20 µL

**7.3 Mobiliario. –**

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

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

- Mascarilla descartable Tipo N-95
- Guante para examen descartable Talla S
- Alcohol etílico (Etanol) 70° X 500 mL
- Algodón hidrófilo X 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 G X 1 In
- Tubo Plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm X 9.1 m
- Gel antibacterial para manos X 1 L Aprox.
- Papel toalla X 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosan X 800 mL
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S

**PNT.DNCC. INEN. 055 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
QUIMERISMO PRE-TRANSPLANTE (RECEPTOR Y DONANTE) V.01**

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

- 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
- Kit de extracción de ADN genómico X 100 determinaciones
- Alcohol etílico (Etanol) 98.0% X 2.5 L
- Agua para PCR X 500 mL
- Tips estéril con filtro 0.1 µL - 10 µL X 96
- Puntera (Tips) estéril con filtro 10 µL - 100 µl X 96
- Tips esteril con filtro 20 µL - 200 µL X 96
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit X 100 determinaciones
- Kit pre-amplificación de 24 marcadores microsatelites para STR por PCR x 200 determinaciones
- Formamida Hidi desionizada ultrapura para secuenciamiento Big Dye X 25 mL
- Solucion tampón (buffer) anodo para analizador genético 3500 X 4 Unidades
- Solucion tampón (buffer) catodo para analizador genético 3500 X 4 Unidades
- Microplaca de polipropileno 96 pocillos para analizador genético Abi 3500
- Reactivo para condicionamiento analizador genético 3500
- Polimero pop 7 para analizador genético 3500 sachet para 384 muestras
- Septa de placa para analizador genético 3500 de 96 pocillos X 20 Unidades
- Septa contenedor buffer catodo para analizador genético 3500 X 10 Unidades
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500
- Estandar de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos De 20 A 600 Pb Marcados con fluorescencia X 800 Determinaciones
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético ABI 3500

**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



**PNT.DNCC. INEN. 055 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE QUIMERISMO PRE-TRANSPLANTE (RECEPTOR Y DONANTE) V.01**

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

**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.
- 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 previamente 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.

**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 preanalítico que considera la línea de bioseguridad, que implican las medidas previas a separación de muestra en un ambiente con bioseguridad tipo II,

**PNT.DNCC. INEN. 055 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE QUIMERISMO PRE-TRANSPLANTE (RECEPTOR Y DONANTE) V.01**

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

limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o médula ósea.

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación**

Se realiza a partir de 200 µL de sangre total/médula 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/µL.

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

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del Kit pre-amplificación de 24 marcadores microsatélites para STR Por PCR que contiene primers específicos, enzima polimerasa para la amplificación 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 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 anodo buffer con las soluciones tampón buffer Anodo y Catodo, 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.

**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 según el "plot setting" GlobalFiler identificándose el perfil alélico de la muestra (par alélico) para los 24 marcadores de microsatélites (STR) según bibliografía (3) y protocolos internos.

**11.8 Elaboración y entrega de resultado**

El biólogo encargado de la prueba elaborará el resultado en la plataforma SISINEN consignando la lista de pares alélicos para los 24 marcadores en archivo interno; el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico, otros exámenes auxiliares y procede a la validación del caso en la plataforma SISINEN.



**PNT.DNCC. INEN. 055 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE QUIMERISMO PRE-TRANSPLANTE (RECEPTOR Y DONANTE) 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. Clark, Jordan R., Stuart D. Scott, Andrea L. Jack, Helena Lee, Joanne Mason, Geoffrey I. Carter, Laurence Pearce, et al. «Monitoring of Chimerism Following Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT): Technical Recommendations for the Use of Short Tandem Repeat (STR) Based Techniques, on Behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group». British Journal of Haematology 168, n.o 1 (enero de 2015): 26-37. <https://doi.org/10.1111/bjh.13073>.
2. Smith A, Nelson RJ. Capillary Electrophoresis of DNA. Curr Protoc Nucleic Acid Chem. 2003;13(1):10.9.1-10.9.16
3. Lion, T., F. Watzinger, S. Preuner, H. Kreyenberg, M. Tilanus, R. de Weger, J. van Loon, et al. «The EuroChimerism Concept for a Standardized Approach to Chimerism Analysis after Allogeneic Stem Cell Transplantation». Leukemia 26, n.o 8 (agosto de 2012): 1821-28. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.66>.

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC. INEN. 055 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE QUIMERISMO PRE-TRANSPLANTE (RECEPTOR Y DONANTE) 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	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN. 056 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE FRAGMENTOS PARA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES 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 FRAGMENTOS PARA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Análisis de Fragmentos para Inestabilidad de Microsatélites.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.11
- Código Tarifario INEN: 210786

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea el para el procedimiento de Análisis de Fragmentos para Inestabilidad de Microsatélites 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/a 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.
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica: 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.
- 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.

**PNT.DNCC. INEN. 056 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE FRAGMENTOS PARA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES V.01**

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

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- **Estudio molecular.** - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- **Muestra de sangre periférica.** - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- **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 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.
- **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.
- **Análisis de Fragmentos.** - Análisis del tamaño y cantidad de fragmentos de DNA amplificados por PCR y marcados con fluorescencia.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Este estudio está indicado para la determinación de la inestabilidad de microsatélites por medio de marcadores definidos según panel de Bethesda (BAT25, BAT26, D2S125,

**PNT.DNCC. INEN. 056 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE FRAGMENTOS PARA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES V.01**

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

D5S346 y D17S250) en casos de sospecha de falla de sistema de reparación de apareamiento de bases (Mismatch repair, MMR) mediante la comparación de los perfiles alélicos de tejido control (sangre periférica) y tejido tumoral. Se utiliza para descarte de síndromes de predisposición genética a cáncer de colon y también para estimar la respuesta al tratamiento adyuvante con 5-fluorouracilo y/o estimar pronóstico.

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

- Cámara de flujo laminar
- Equipo baño maria de calor seco
- Vórtex Genie 2 Mixer
- Microcentrifuga
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Micrótopo de rotación
- Analizador genético automatizado
- Termociclador

**7.2 Instrumentales. –**

- Micropipeta volumen variable 0.5 µL -10 µL
- Micropipeta volumen variable 20 µL -200 µL
- Micropipeta volumen variable 2 µL – 20 µL
- Micropipeta volumen variable 100 µL – 20 µL

**7.3 Mobiliario. –**

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

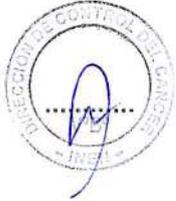
**VIII. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:**

- Mascarilla descartable tipo N95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja multiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con edta
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosan x 800 mL
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S

**PNT.DNCC. INEN. 056 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE FRAGMENTOS PARA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES V.01**

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

- 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
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 1 L
- Aguja hipodérmica descartable N° 21 g x 1 1/2 In
- Hoja de bisturí descartable N° 22
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500
- Xilol q.p. x 1 L
- Jeringa descartable de tuberculina 1 mL con aguja 26 g x 1/2 In
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Kit de extracción de ADN genómico x 50 determinaciones
- Kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado x 50 reacciones
- Plumón resaltador punta mediana biselada
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Primer IMS-BAT-25-R 5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'
- Primer IMS-BAT-26-R 5'-AACCATTCAACATTTTAAACCC-3'
- Primer IMS-NR-21-R 5'-ATTCCTACTCCGCATTCACA-3'
- Primer IMS-NR-22-R 5'-AATTCGGATGCCATCCAGTT-3'
- Primer IMS-NR-24-R 5'-ATTGTGCCATTGCATTCCAA-3'
- Sonda IMS-BAT-25-F 5'-[NED]TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3'
- Sonda IMS-BAT-26-F 5'-[FAM]TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3'
- Sonda IMS-NR-21-F 5'-[VIC]TAAATGTATGTCTCCCCTGG-3'
- Sonda IMS-NR-22-F 5'-[FAM]GAGGCTTGTCAAGGACATAA-3'
- Sonda IMS-NR-24-F 5'-[VIC]CCATTGCTGAATTTTACCTC-3'
- Enzima taq hot start DNA polimerasa (5u/ul) x 500 u x 500 determinaciones
- Deoxinucleotidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Tips estéril con filtro 0.5 µL - 10 µL (máxima recuperación) x 96 uni/rack
- Formamida Hidi desionizada ultrapura para secuenciación Big Dye x 25 mL
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Estandar de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 a 600 pb marcados con fluorescencia x 800 determinaciones
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético abi 3500



**PNT.DNCC. INEN. 056 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE FRAGMENTOS PARA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES 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**

- 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.
- 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 desoxirribonucleico (ADN).

**10.3. Recipiente**

- Sangre venosa: Tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): Bloque de 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
- Los necesarios al bloque de parafina.

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

Basado en metodología descrita por bibliografía actual 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.

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

**PNT.DNCC. INEN. 056 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE FRAGMENTOS PARA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES 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 Revisión de láminas**

Realizado por el médico patólogo quien define regiones de estudio, con el criterio de más de 10% de carga tumoral.

**11.4 Cortes de tejido**

Luego de identificar la región a estudiar, se realizará por lo menos 5 cortes de 1µ-1.5µ del bloque de parafina, material que será colocado en un tubo de 1.5 mL para el siguiente paso.

**11.5 Desparafinización de la muestra**

Los cortes en los tubos de 1.5 mL se someten a una batería de alcoholes (xilol) para realizar la desparafinación.

**11.6 Extracción y cuantificación de ADN**

Se realiza a partir de 200ul de sangre total y del tejido desparafinado por medio del kit de extracción de ADN genómico y por método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante; los pellets obtenidos contienen 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.

**11.7 Amplificación**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio de uso de primers para los 5 marcadores de microsatélites (BAT25, BAT26, D2S125, D5S346 y D17S250) por medio del 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 de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

**11.8 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 anodo buffer con las soluciones tampón buffer Anodo y Catodo, 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. 056 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE FRAGMENTOS PARA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES V.01**

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

**11.9 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; se define la diferencia entre los patrones normal (sangre) y tumoral; se interpreta como Estabilidad de microsatélites (MSS) cuando el patrón de ambos es similar y será Inestabilidad alta (MSI-H) si existe diferencia en los patrones de por lo menos dos marcadores; según bibliografía y protocolos internos.

**11.10 Elaboración y entrega de resultado**

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

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Hegde M, Ferber M, Mao R, Samowitz W, Ganguly A, Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). Genet Med. 2014 Jan;16(1):101–16.

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC. INEN. 056 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE ANÁLISIS DE FRAGMENTOS PARA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES 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	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN. 057 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA 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 MOLECULAR PARA  
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Panel Molecular para Leucemia Mieloide Aguda por PCR en tiempo final y análisis de fragmentos.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88299.23
- Código Tarifario INEN: 210764

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Panel Molecular para Leucemia Mieloide Aguda 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/a 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/a 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.
- 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.
- 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**

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

**PNT.DNCC. INEN. 057 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA V. 01**

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

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

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Prueba utilizada para el diagnóstico y gradación de riesgo (pronóstico) de leucemias agudas de estirpe linfóide en pacientes pediátricos y adultos; según guías actuales internacionales (The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia) (1) así como el impacto en el pronóstico (2).

**PNT.DNCC. INEN. 057 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA V. 01**

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

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos (02)
- Vórtex
- Microcentrífuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador con gradiente de temperatura de 96 pocillos
- Analizador genético automatizado
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Computadora

**7.2 Instrumentales**

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

**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:**

- Mascarilla descartable Tipo N95
- Guante para examen descartable Talla S
- Alcohol etílico (Etanol) 70° X 500 mL
- Algodón hidrófilo X 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 G X 1 In
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm X 9.1 m
- Gel antibacterial para manos X 1 L aprox.
- Papel Toalla X 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosan X 800 mL
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S



**PNT.DNCC. INEN. 057 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA 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
- 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
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm X 51 cm color rojo
- Reactivo para extracción de ARN X 100 mL
- Solucion Tampón (Buffer) para lisis de glóbulos rojos X 100 mL
- Tubo de polipropileno, fondo cónico esteril X 15 mL
- Ficoll-Hypaque Densidad 1.077 G/ML X 100 mL
- Sodio cloruro 900 mg/100 mL (0.9 %) lny 1 L
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500 unidades
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL X 1000 unidades
- Tips con filtro 1000 uL X 96 unidades
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI X 96 unidades
- Alcohol Isopropílico (Isopropanol) P.A. X 2.5 L
- Cloroformo grado biología molecular X 1 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% X 2.5 L
- Agua para PCR X 500 mL
- Calibrador para ADN para fluorómetro Qubit X 100 determinaciones
- Enzima transcriptasa reversa x 200 µL determinaciones
- Kit De extracción de ADN genómico X 100 determinaciones
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit X 100 determinaciones
- Primer Aml1-A 5'-CTACCGCAGCCATGAAGAACC-3' 50 Nm
- Primer Aml1-C 5'-ATGACCTCAGGTTTGTTCGGTCG-3' 50 Nm
- Primer Eto-B 5'-AGAGGAAGGCCATTGCTGAA-3' 50 Nm
- Primer Eto-D 5'-TGAAGTGGTCTTGGAGCTCCT-3' 50 Nm
- Enzima Taq Hot Start DNA Polimerasa (5U/UI) X 1000 unidades
- Primer Abl-A3-B 5'-GTTTGGGCTTACACCATTCC-3' 50 Nm
- Primer Abl-D 5'-TGTGTATATAGCCTAAGACCCGGAG-3' 50 Nm
- Deoxinucleotidos Dntps 4 X 40 Umol En Concentracion 100 Mm (Kit)
- Agua Para Pcr X 500 mL
- Primer Cbfb-A: 5' GCAGGCAAGGTATATTTGAAGG 3' X 100 Nm
- Primer Cbf-C: 5' GGGCTGTCTGGAGTTTGATG 3' X 100 Nm
- Primer Myh11-B1: 5' TGAAGCAACTCCTGGGTGTC 3' X 100 Nm
- Primer Myh11-B2: 5' TCCTCTTCTCCTCATTCTGCTC 3' X 100 Nm
- Primer FLT3-14F1 FAM-5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' 50 Nm
- Primer FLT3-E15R 5'-CTTTGAGCATTGTTGACGGCAACC-3' 50 Nm
- Primer Npm1-An 5'-CAAGAGGCTATTCAAGATCTCTGTCTG-3' 50 Nm
- Primer NPM1-F 5'-FAM-ACTCTCTGGTGGTAGAATGAA-3' X 50 nmol
- 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

**PNT.DNCC. INEN. 057 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA V. 01**

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

- Agarosa grado biología molecular X 500 g
- Buffer de carga 6X X 1 mL
- Formamida hidr desionizada ultrapura para secuenciamiento big dye X 25 mL
- Solución tampón (Buffer) ánodo para analizador genético 3500 X 4 unidades
- Solución tampón (Buffer) cátodo para analizador genético 3500 X 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 X 10 unidades
- Estandar de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 A 600 Pb marcados con fluorescencia X 800 determinaciones.

**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**

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.

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 desoxiribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxiribonucleico 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.

**PNT.DNCC. INEN. 057 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA 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**

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 Van Dongen et al y bibliografía actual 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.

**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 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 de sangre periférica y/o médula ósea.

**11.4 Separación de linfocitos**

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

**11.5 Extracción de ARN y cuantificación**

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/μL.

**PNT.DNCC. INEN. 057 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA V. 01**

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

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

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

**11.7 Amplificación**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para los genes de fusión AML1/ETO y CBFβ/MYH11, uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene los productos amplificados de las regiones específicas.

**11.8 Preparación de gel**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer TAE que nos 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).

**11.9 Análisis de resultado**

El análisis del gel se realiza posterior a la corrida electroforética y visualización en equipo de luz UV (luminómetro) para definir la presencia de los genes de fusión (bandas de peso molecular específicos para los genes AML1/ETO y CBFβ/MYH11 según bibliografía y protocolos internos.

**11.10 Extracción de ADN y cuantificación**

Se realiza a partir de 200 µL 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/ µL.

**11.11 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 para el exón 12 del gen NPM1, 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 de calor en el termociclador y se obtiene los productos amplificados de las regiones específicas.

**11.12 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 anodo y catodo, así como los capilares deben contener el polímero Pop 7 y los estándares de tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos de 20 a 600pb

**PNT.DNCC. INEN. 057 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA V. 01**

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

marcados con fluorescencia; luego se da inicio a la electroforesis capilar según el programa específico para el análisis de fragmentos determinado.

**11.13 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; para 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 (7)(8) y protocolos internos así mientras que para 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 y protocolos internos.

**11.14 Elaboración y entrega de resultado**

El/la biólogo/a encargado de la prueba elaborará el resultado en la plataforma SISINEN; el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico, otros exámenes auxiliares y procede a la validación del caso en la plataforma 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. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. diciembre de 1999; 13(12):1901.
4. Smith A, Nelson RJ. Capillary Electrophoresis of DNA. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2003;13(1):10.9.1-10.9.16
5. 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.
6. 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
7. 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.



**PNT.DNCC. INEN. 057 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA 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 - 10	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez





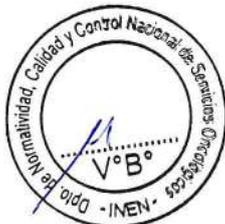
**PNT.DNCC. INEN. 057 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL MOLECULAR PARA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA V. 01**

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

- 8. 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. ANEXOS**

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



**PNT.DNCC. INEN. 058 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIÓN V617F GEN JAK2 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 V617F  
GEN JAK2****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Detección de Mutación V617F Gen JAK2.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81270
- Código Tarifario INEN: 210725

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección de Mutación V617F Gen JAK2 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 el personal asistencial y directivo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento:

- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: supervisa el proceso, apoya en el análisis de resultado y valida los resultados obtenidos en el Sistema de Información Hospitalaria SISINEN.
- Biólogo/a del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: realiza los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, separación de Linfocitos, extracción y cuantificación de ARN, transformación de ARN en molécula cDNA, amplificación, preparación de gel, análisis y emisión de resultado.
- Técnico/a 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.
- 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.
- 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.

**PNT.DNCC. INEN. 058 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIÓN V617F GEN JAK2 V.01**

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

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

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

**PNT.DNCC. INEN. 058 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIÓN V617F GEN JAK2 V.01**

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

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

- Mascarilla descartable tipo N95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 In
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500
- Tips con filtro 1000 UI X 96
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI X 96
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% X 2.5 L
- Agua para PCR X 500 mL
- Kit de extracción de ADN genómico X 100 determinaciones
- Calibrador para ARN para fluorómetro Qubit X 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL X 1000 unidades
- Enzima transcriptasa reversa X 200 determinaciones
- Primer JAK2-F1 5'-ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG-3' 50 Nm
- Primer JAK2-F 5'-AGCATTGGTTTTAAATTATGGAGTATATT-3' 50 Nm
- Primer JAK2-R 5'-CTGAATAGTCCTACAGTGTTCAGTTTCA-3' 50 Nm
- Enzima taq hot start DNA polimerasa (5U/UI) X 1000 Unidades
- Deoxinucleótidos Dntps 4 X 40 umol en concentración 100 Mm (Kit)
- 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



**PNT.DNCC. INEN. 058 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIÓN V617F GEN JAK2 V.01**

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

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Prueba utilizada para estudio de variante específica V617F del gen JAK2 utilizado para determinación de diagnóstico, pronóstico y manejo en caso de sospecha de neoplasias mieloproliferativas en pacientes pediátricos y adultos, según guías actuales internacionales.

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos (02)
- Vórtex
- Microcentrífuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora láser blanco y negro 52 ppm
- Lectora de código de barras
- Impresora de código de barras térmica 102 mm/seg
- Monitor Plano de 20 In

**7.2 Instrumentales**

- Micropipeta volumen variable 0.5 µL -10 µL
- Micropipeta volumen variable 20 µL -200 µL
- Micropipeta volumen variable 2 µL – 20 µL
- Micropipeta volumen variable 100 µL – 20 µL

**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

**PNT.DNCC. INEN. 058 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIÓN V617F GEN JAK2 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**

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.

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 por bibliografía actual 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.

**PNT.DNCC. INEN. 058 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIÓN V617F GEN JAK2 V.01**

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

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 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 de sangre periférica y/o médula ósea.

**11.4 Extracción y cuantificación de ADN:**

Por medio del kit de extracción de ADN genómico y por método de columnas se obtendrá un pellet que contiene el ácido nucleico, el cual será resuspendido con agua de grado molecular, luego es necesario definir la cantidad de ácido nucleico; 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/μl.

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

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

**11.6 Amplificación**

Se prepara el proceso de PCR convencional, identificando la región a amplificar por medio de primers específicos para el exón 14 del gen JAK2, uso de enzima polimerasa para la amplificación (enzima taq hot star DNA polimerasa) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.

**11.7 Preparación de gel**

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

**11.8 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 diferencia entre el alelo normal (wild type) y el alelo mutado (V617F) según bibliografía y protocolos internos.



**PNT.DNCC. INEN. 058 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN V617F GEN JAK2 V.01**

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

**11.9 Elaboración y entrega de resultado**

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

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. Blood Cancer J. 2018 09;8(2):15.
2. Vigil AMA, Alonso CAD, Santana HG, González YS, Delgado NF, Cabrera OMA, et al. Introducción del estudio molecular de la mutación V617F del gen JAK2 en neoplasias mieloproliferativas clásicas BCR-ABL negativas. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 2013;29(4).

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC. INEN. 058 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN V617F GEN JAK2 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	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez





**PNT.DNCC. INEN. 059 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA1 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 POR  
SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN BRCA1**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Deteccion por Secuenciamiento de Variante Patogénica Familiar en el Gen BRCA1.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA) 81215
- Código Tarifario INEN 210782

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea el para el procedimiento de Deteccion por Secuenciamiento de Variante Patogénica Familiar en el Gen BRCA1 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/a 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 genético, análisis y emisión de resultado.
- Técnico/a 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.



**PNT.DNCC. INEN. 059 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA1 V.01**

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

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- **Estudio molecular.** - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- **Punción de médula ósea.** - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- **Muestra de sangre periférica.** - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- **Solución anticoagulante.** - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- **Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).** - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- **Ácido nucleico.** - Biomolécula portadora de la información genética, biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- **Ácido desoxirribonucleico (ADN).** - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- **Ácido ribonucleico (ARN).** - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- **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 – 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.
- **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.



**PNT.DNCC. INEN. 059 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA1 V.01**

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

- **Línea germinal.** - Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores.

## VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Estudio de búsqueda de variante patogénica y/o probablemente patogénico familiar en familiares de pacientes con diagnóstico molecular de síndrome de de cáncer de mama/ovario hereditario o espectro fenotípico asociado a BRCA1, esta prueba sirve para identificar individuos portadores y definir estrategias de control de riesgos y reducción de riesgos en estos portadores.

## VII. EQUIPAMIENTO

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

- Cámara de flujo laminar
- Centrifuga para tubos (02)
- Vórtex genie
- Refrigeradora de 02 puertas
- Microcentrifuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado
- Analizador genético automatizado
- Termociclador
- Cámara fotografica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroferesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador

### 7.2 Instrumentales. -

- Micropipeta volumen variable 0.5 µL -10 µL
- Micropipeta volumen variable 20 µL -200 µL
- Micropipeta volumen variable 2 µL – 20 µL
- Micropipeta volumen variable 100 µL – 20 µL

### 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





**PNT.DNCC. INEN. 059 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA1 V.01**

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

### VIII. SUMINISTROS

#### 8.1 Insumos y material:

- Mascarilla descartable tipo N95
- 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
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Jabon germicida líquido x 800 mL
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 unidades
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 unidades
- Tips con filtro 1000 uL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Alcohol etílico (etanol) 98.0% x 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones.
- Primer BRCA1-E11 F 5'-GGTAAAGAACCTGCAACTGG X 50 Nmol
- Primer BRCA1-E11 R 5'-TCAAATGCTGCACACTGACT X 50 Nmol
- Enzima taq adn polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 unidades
- Deoxinucleótidos Dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 Mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100 Pb Ladder) x 250 UI
- Solución tampón (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
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Primer BRCA1-E11 F 5'-GGTAAAGAACCTGCAACTGG X 50 Nmol
- Primer BRCA1-E11 R 5'-TCAAATGCTGCACACTGACT X 50 Nmol
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones.
- Solución tampón (buffer) anodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) catodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Microplaca de polipropileno 96 pocillos para analizador genético abi 3500



**PNT.DNCC. INEN. 059 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA1 V.01**

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

- 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 unidades
- Septa contenedor buffer catodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético ABI 3500

**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 desoxirribonucleico (ADN) viral.

**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.

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

Basado en metodología descrita por bibliografía actual 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.





**PNT.DNCC. INEN. 059 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA1 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 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 de sangre periférica.



**11.4 Extracción de ADN y cuantificación**

Se realiza a partir de 200 µl 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/µl.



**11.5 Amplificación por PCR de región de interes**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para la región de exón a estudiar según antecedente familiar del gen BRCA1 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 con electroforesis**

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 pasos de centrifugación y lavados; el producto final debe ser cuantificado para determinar adecuada cantidad para la reacción de secuenciamiento.





**PNT.DNCC. INEN. 059 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA1 V.01**

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

**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 a estudiar según antecedente familiar del gen BRCA1, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación 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 µL).

**11.10 Secuenciamiento genético**

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero Pop 7; luego se inicia la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para el gen a analizar.

**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 según bibliografía y protocolos internos.

**11.12 Elaboración y entrega de resultado**

El biólogo encargado de la prueba analizará la secuencia del exón estudiado para determinar la presencia de la variante familiar y elaborará el resultado de la prueba, con esa información, el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico y procede a presentarlo al grupo de trabajo (biólogos y médicos genetistas), luego se realizará la validación múltiple con por lo menos por 3 médicos genetistas y posterior impresión de resultado en formato interno.

**XII. 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



**PNT.DNCC. INEN. 059 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN BRCA1 V.01**

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

- 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.





**PNT.DNCC. INEN. 059 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN BRCA1 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	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez







**PNT.DNCC. INEN. 060 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA2 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 DETECCION POR  
SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN BRCA2**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Detección por Secuenciamiento de Variante Patogénica Familiar en el Gen BRCA2.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81217
- Código Tarifario INEN: 210783

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección por Secuenciamiento de Variante Patogénica Familiar en el Gen BRCA2 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/a 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/a 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.



**PNT.DNCC. INEN. 060 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA2 V.01**

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

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- **Estudio molecular.** - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- **Punción de médula ósea.** - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- **Muestra de sangre periférica.** - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- **Solución anticoagulante.** - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- **Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).** - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- **Ácido nucleico.** - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- **Ácido desoxirribonucleico (ADN).** - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- **Ácido ribonucleico (ARN).** - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- **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 – 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.
- **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.





**PNT.DNCC. INEN. 060 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA2 V.01**

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

- **Línea germinal.** - Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores.

## VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Estudio de búsqueda de variante patogénica y/o probablemente patogénico familiar en familiares de pacientes con diagnóstico molecular de Síndrome de de cáncer de mama/ovario hereditario o espectro fenotípico asociado a BRCA2, esta prueba sirve para identificar individuos portadores y definir estrategias de control de riesgos y reducción de riesgos en estos portadores.

## VII. EQUIPAMIENTO

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos (02)
- Vórtex Genie
- Refrigeradora de 02 puertas
- Microcentrifuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado
- Analizador genético automatizado
- Termociclador
- Cámara fotografica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador

### 7.2 Instrumentales. -

- Micropipeta volumen variable 0.5 µL -10 µL
- Micropipeta volumen variable 20 µL -200 µL
- Micropipeta volumen variable 2 µL – 20 µL
- Micropipeta volumen variable 100 µL – 20 µL

### 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





**PNT.DNCC. INEN. 060 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA2 V.01**

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

### VIII. SUMINISTROS

#### 8.1 Insumos y material:

- Mascarilla descartable tipo N95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 G x 1 In
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos X 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosan x 800 mL
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 unidades
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 unidades
- Tips con filtro 1000 uL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96 unidades
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Alcohol etílico (Etanol) 98 % x 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- Primer BRCA2-E13 F 5'-TTGAGCATCTGTTACATTCCTG
- Primer BRCA2-E13 R 5'-TTAACTGATTCGGAGCAATTTCT
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 u
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 Mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 uL
- Solución tampón (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
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciación Bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciación x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) anodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer catodo para analizador genético 3500 x 10 unidades



**PNT.DNCC. INEN. 060 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA2 V.01**

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

- Arreglo de 8 capilares para analizador genético ABI 3500

## 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 desoxirribonucleico (ADN).

### 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.

## XI. MODO OPERATIVO / DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Basado en metodología descrita previamente 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.

### 11.2 Registro de la muestra

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



**PNT.DNCC. INEN. 060 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA2 V.01**

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

**11.3 Procesamiento de la muestra**

Proceso 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 de sangre periférica.



**11.4 Extracción de ADN y cuantificación**

Se realiza a partir de 200 µL 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/µL.



**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 a estudiar según antecedente familiar del gen BRCA2 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 con electroforesis**

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 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 Big Dye terminator y primers específicos para la región de exón a estudiar según antecedente familiar del gen BRCA2, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación por medio de ciclos de calor.





## PNT.DNCC. INEN. 060 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN BRCA2 V.01

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

### 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 µL).

### 11.10 Secuenciamiento genético

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: Anodo y Catodo; así como con los capilares que contienen el polímero Pop 7; luego se inicia la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para el gen a analizar.

### 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 según bibliografía y protocolos internos.

### 11.12 Elaboración y entrega de resultado

El biólogo/a encargado de la prueba analizará la secuencia del exón estudiado para determinar la presencia de la variante familiar y elaborará el resultado de la prueba, con esa información, el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico y procede a presentarlo al grupo de trabajo (biólogos y médicos genetistas), luego se realizará la validación múltiple con por lo menos por 3 médicos genetistas y posterior impresión de resultado en formato interno.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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
- International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004 Oct 21;431(7011):931–45
- 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
- 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



**PNT.DNCC. INEN. 060 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN BRCA2 V.01**

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

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC. INEN. 060 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN BRCA2 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	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez







**PNT.DNCC. INEN. 061 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN VHL 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 POR  
SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN VHL**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Deteccion por Secuenciamiento de Variante Patogénica Familiar en el Gen VHL.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81404.04
- Código Tarifario INEN: 210785

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Deteccion por Secuenciamiento de Variante Patogénica Familiar en el Gen VHL 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/a 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/a 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.



**PNT.DNCC. INEN. 061 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN VHL V.01**

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

**V. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- **Estudio molecular.** - Es el uso de técnicas de biología molecular para identificar alteraciones en el ADN y/o ARN que son responsables del origen y desarrollo de neoplasias.
- **Punción de médula ósea.** - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- **Muestra de sangre periférica.** - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- **Solución anticoagulante.** - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- **Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).** - Es un agente quelante usado como anticoagulante para la protección completa de células de la sangre, especialmente de plaquetas y garantiza que la forma y el volumen de la sangre no sea influenciada en un largo tiempo.
- **Ácido nucleico.** - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado nucleótido.
- **Ácido desoxirribonucleico (ADN).** - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- **Ácido ribonucleico (ARN).** - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- **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 – 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.
- **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.





**PNT.DNCC. INEN. 061 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN VHL V.01**

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

- **Línea germinal.** - Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores.

## VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Estudio de búsqueda de variante patogénica y/o probablemente patogénica familiar en familiares de pacientes con diagnóstico molecular de síndrome de Von Hippel Lindau o Espectro fenotípico asociado al gen VHL esta prueba sirve para identificar individuos portadores y definir estrategias de control de riesgos y reducción de riesgos en estos portadores.

## VII. EQUIPAMIENTO

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

- Cámara de flujo laminar, calse II
- Centrifuga para tubos (02)
- Vórtex genie
- Refrigeradora de 02 puertas
- Microcentrifuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado
- Analizador genético automatizado
- Termociclador
- Cámara fotografica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroferesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador

### 7.2 Instrumentales. -

- Micropipeta volumen variable 0.5 µL -10 µL
- Micropipeta volumen variable 20 µL -200 µL
- Micropipeta volumen variable 2 µL – 20 µL
- Micropipeta volumen variable 100 µL – 20 µL

### 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



**PNT.DNCC. INEN. 061 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN VHL V.01**

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

### VIII. SUMINISTROS

#### 8.1 Insumos y material:

- Mascarilla descartable tipo N95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° X 500 mL
- Algodón hidrófilo X 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g X 1 In
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosan x 800 mL
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Bolsa de polietileno 72 cm X 51 cm color rojo
- Mandilón descartable talla M
- Kit de extracción de ADN genómico X 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL X 500 unidades
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL X 1000 unidades
- Tips con filtro 1000 ul X 96 unidades
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL X 96 unidades
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Alcohol etílico (Etanol) 98.0% x 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- Primer VHL EX1F: 5'-CGAAGACTACGGAGGTCGAC-3' X 1000 determinaciones
- Primer VHL EX1R: 5'-GGCTTCAGACCGTGCTATCG-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)
- Marcador de peso molecular (100 Pb ladder) X 250 µL
- Solución tampón (buffer) tris acetato - EDTA 10 X 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000 X 200 uL
- Agarosa grado biología molecular X 500 G
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciación Bigdye terminator V3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciación x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Microplaca de polipropileno 96 pocillos para analizador genético abi 3500





**PNT.DNCC. INEN. 061 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN VHL V.01**

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

- Reactivo para condicionamiento analizador genético 3500
- Polimero pop 7 para analizador genético 3500 sachet para 384 muestras
- Septa de placa para analizador genético 3500 de 96 pocillos x 20 unidades
- Septa contenedor buffer catodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético ABI 3500

**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 desoxirribonucleico (ADN).

**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.

**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**

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



**PNT.DNCC. INEN. 061 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR  
EN EL GEN VHL 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**

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 de sangre periférica.

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación**

Se realiza a partir de 200 µL 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/µL.

**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 a estudiar según antecedente familiar 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 con electroforesis**

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 pasos de centrifugación y lavados; el producto final debe ser cuantificado para determinar adecuada cantidad para la reacción de secuenciamiento.





## PNT.DNCC. INEN. 061 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN VHL V.01

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

### 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 a estudiar según antecedente familiar del gen VHL, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación 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 µL).

### 11.10 Secuenciamiento genético

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero Pop 7; luego se inicia la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para el gen a analizar.

### 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 según bibliografía y protocolos internos.

### 11.12 Elaboración y entrega de resultado

El biólogo encargado de la prueba analizará la secuencia del exón estudiado para determinar la presencia de la variante familiar y elaborará el resultado de la prueba, con esa información, el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico y procede a presentarlo al grupo de trabajo (biólogos y médicos genetistas), luego se realizará la validación múltiple con por lo menos por 3 médicos genetistas y posterior impresión de resultado en formato interno.

## 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



**PNT.DNCC. INEN. 061 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN VHL V.01**

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

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.
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. ANEXO**

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





PERÚ

Sector Salud

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas



### PNT.DNCC. INEN. 061 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN VHL 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	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez





**PNT.DNCC. INEN. 062 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN CDH1 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 POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN CDH1****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Detección por Secuenciamiento de Variante Patogénica Familiar en el Gen CDH1.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81404.03
- Código Tarifario INEN: 210779

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección por Secuenciamiento de Variante Patogénica Familiar en el Gen CDH1 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, apoya en el análisis y realiza la revisión del caso y de las variantes encontradas, así como válida los resultados impresos en físico.
- Biólogo/a 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**

- **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. 062 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN CDH1 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.
- **Ácido nucleico.** - Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado nucleótido.
- **Ácido desoxirribonucleico (ADN).** - Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los órganos vivos y algunos virus; es responsable de su transmisión hereditaria.
- **Ácido ribonucleico (ARN).** - Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y síntesis de proteínas.
- **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 – 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.
- **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.
- **Línea germinal.** - Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de búsqueda de variante patogénica y/o probablemente patogénica familiar en familiares de pacientes con diagnóstico molecular de síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario o el espectro fenotípico asociado al gen CDH1 esta prueba sirve para identificar individuos portadores y definir estrategias de control de riesgos y reducción de riesgos en estos portadores.

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos



**PNT.DNCC. INEN. 062 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN CDH1 V.01**

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

- Vórtex Genie 2 mixer, color blanco humo
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador

**7.2 Instrumentales**

- Micropipeta volumen variable 0.5 µL – 10 µL
- Micropipeta volumen variable 20 µL - 200 µL
- Micropipeta volumen variable 2 µL - 20 µL
- Micropipeta volumen variable 100 µL - 20 µL

**7.3 Mobiliario**

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

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

- Mascarilla descartable tipo N95
- 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 ln
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Mandilón descartable talla M
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 unidades
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 unidades

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

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



**PNT.DNCC. INEN. 062 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN  
POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN CDH1 V.01**

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

- Tips con filtro 1000 µL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 0.1 µL - 10 µL x 96 unidades
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Alcohol etílico (etanol) 98% x 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Primer CDH1 12 F: 5'- M13F AAGGCAATGGGGATTGATTA-3'
- Primer CDH1 12 R: 5'- M13R ATTGAAAGGTGGGGATCTGG-3'
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 u
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100 pb Ladder) x 250 µL
- Solución tampón (buffer) tris acetato - EDTA 10x x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000x x 200 µL
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciación Bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciación x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético ABI 3500

**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 Desoxirribonucleico (ADN).

**10.3. Recipiente**

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



**PNT.DNCC. INEN. 062 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN CDH1 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**

- 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.

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

Basado en metodología descrita previamente 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.

**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 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 de sangre periférica.

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación**

Se realiza a partir de 200 µL 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/µL.

**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 a estudiar según antecedente familiar del gen CDH1 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 con electroforesis**

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. 062 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN CDH1 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 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 a estudiar según antecedente familiar del gen CDH1, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación 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 µL).

**11.10 Secuenciamiento genético**

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero pop 7; luego se inicia la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para el gen a analizar.

**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 según bibliografía y protocolos internos.

**11.12 Elaboración y entrega de resultado**

El/La Biólogo/a encargado/a de la prueba analizará la secuencia del exón estudiado para determinar la presencia de la variante familiar y elaborará el resultado de la prueba, con esa información, el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico y procede a presentarlo al grupo de trabajo (biólogos y médicos genetistas), luego se realizará la validación múltiple por lo menos por tres médicos genetistas y posterior impresión de resultado en formato interno.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Post, Rachel S. van der, Ingrid P. Vogelaar, Fátima Carneiro, Parry Guilford, David Huntsman, Noline Hoogerbrugge, Carlos Caldas, et al. «Hereditary Diffuse Gastric Cancer: Updated Clinical Guidelines with an Emphasis on Germline CDH1 Mutation Carriers». *Journal of Medical Genetics* 52, n.o 6 (junio de 2015): 361-74. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103094>.
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931–45



**PNT.DNCC. INEN. 062 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN CDH1 V.01**

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

3. Moreira-Nunes, Caroline Aquino, Mariceli Baia Leão Barros, Bárbara do Nascimento Borges, Raquel Carvalho Montenegro, Leticia Martins Lamarão, Helem Ferreira Ribeiro, Amanda Braga Bona, et al. «Genetic Screening Analysis of Patients with Hereditary Diffuse Gastric Cancer from Northern and Northeastern Brazil». Hereditary Cancer in Clinical Practice 12, n.o 1 (2014): 18. <https://doi.org/10.1186/1897-4287-12-18>.
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.





**PNT.DNCC. INEN. 062 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN CDH1 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	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN. 063 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN TP53 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 POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN TP53****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Detección por Secuenciamiento de Variante Patogénica Familiar en el Gen TP53.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81404.07
- Código Tarifario INEN: 210787

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección por Secuenciamiento de Variante Patogénica Familiar en el Gen TP53 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, apoya en el análisis y realiza la revisión del caso y de las variantes encontradas, así como válida los resultados impresos en físico.
- Biólogo/a 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/a 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**

- **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. 063 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN TP53 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.
- **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.
- **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 – 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.
- **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.
- **Línea germinal.** - Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de búsqueda de variante patogénica y/o probablemente patogénica familiar en familiares de pacientes con diagnóstico molecular de Síndrome de Li Fraumeni o Espectro fenotípico asociado al gen TP53 (1) esta prueba sirve para identificar individuos portadores y definir estrategias de control de riesgos y reducción de riesgos en estos portadores.

**PNT.DNCC. INEN. 063 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN TP53 V.01**

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

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

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

**7.2 Instrumentales**

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

**7.3 Mobiliario**

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

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

- Mascarilla descartable tipo N95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste

**PNT.DNCC. INEN. 063 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN TP53 V.01**

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

- 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
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 unidades
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 unidades
- Tips con filtro 1000 µL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 0.1 µL - 10 µL x 96 unidades
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit X 100 determinaciones
- Primer P53 EXON 2-3 F: 5'-CAGGGTTGGAAGTGTCT-3' X 1000 determinaciones
- Primer P53 EXON 2-3 R: 5'-GGACTGTAGATGGGTGAA-3' X 1000 determinaciones
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad X 100 unidades
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100 pb Ladder) x 250 µL
- Solución tampón (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
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciamiento Bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético ABI 3500

**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



**PNT.DNCC. INEN. 063 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN TP53 V.01**

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

**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 Desoxirribonucleico (ADN).

**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.

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

Basado en metodología descrita previamente 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.

**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/la Biólogo/a.

**11.3 Procesamiento de la muestra**

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 de sangre periférica

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación**

Se realiza a partir de 200 µL 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/µL.



**PNT.DNCC. INEN. 063 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN TP53 V.01**

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

**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 a estudiar según antecedente familiar del gen TP53 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 con electroforesis**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (TAE) que 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 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 a estudiar según antecedente familiar del gen TP53, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación 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 µL).

**11.10 Secuenciamiento genético**

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero Pop 7; luego se inicia la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para el gen a analizar.

**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 según bibliografía y protocolos internos.



**PNT.DNCC. INEN. 063 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN TP53 V.01**

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

**11.12 Elaboración y entrega de resultado**

El/la Biólogo/a encargado/a de la prueba analizará la secuencia del exón estudiado para determinar la presencia de la variante familiar y elaborará el resultado de la prueba, con esa información, el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico y procede a presentarlo al grupo de trabajo (biólogos y médicos genetistas), luego se realizará la validación múltiple con por lo menos por 3 médicos genetistas y posterior impresión de resultado en formato interno.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Kratz, Christian P., Maria Isabel Achatz, Laurence Brugières, Thierry Frebourg, Judy E. Garber, Mary-Louise C. Greer, Jordan R. Hansford, et al. «Cancer Screening Recommendations for Individuals with Li-Fraumeni Syndrome». *Clinical Cancer Research* 23, n.o 11 (1 de junio de 2017): e38-45. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0408>.
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931-45
3. Bendig, Ines, Nicole Mohr, Franziska Kramer, y Bernhard H. F. Weber. «Identification of Novel TP53 Mutations in Familial and Sporadic Cancer Cases of German and Swiss Origin». *Cancer Genetics and Cytogenetics* 154, n.o 1 (1 de octubre de 2004): 22-26. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2004.02.017>.
4. Leroy, Bernard, Mandy L. Ballinger, Fanny Baran-Marszak, Gareth L. Bond, Antony Braithwaite, Nicole Concini, Lawrence A. Donehower, et al. «Recommended Guidelines for Validation, Quality Control, and Reporting of TP53 Variants in Clinical Practice». *Cancer Research* 77, n.o 6 (15 de 2017): 1250-60. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2179>.
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. ANEXO**

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





**PNT.DNCC. INEN. 063 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN TP53 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	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN. 064 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MLH1 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 POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MLH1****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Detección por Secuenciamiento de Variante Patogénica Familiar en el Gen MLH1.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81293
- Código Tarifario INEN: 210780

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea el para el procedimiento de Detección por Secuenciamiento de Variante Patogénica Familiar en el Gen MLH1 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 válida los resultados impresos en físico.
- Biólogo/a 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/a 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**

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



**PNT.DNCC. INEN. 064 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MLH1 V.01**

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

- **Punción de médula ósea.** - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- **Muestra de sangre periférica.** - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- **Solución anticoagulante.** - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- **Ácido 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.
- **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.
- **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.
- **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.
- **Línea germinal.** - Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de búsqueda de variante patogénica y/o probablemente patogénica familiar en familiares de pacientes con diagnóstico molecular de Síndrome de Lynch o Espectro fenotípico asociado a gen MLH1 (1) esta prueba sirve para identificar individuos portadores y definir estrategias de control y reducción de riesgos en estos portadores.

**PNT.DNCC. INEN. 064 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MLH1 V.01**

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

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos
- Vórtex Genie 2 mixer, color blanco humo
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Computadora

**7.2 Instrumentales**

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

**7.3 Mobiliario**

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

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

- Mascarilla descartable tipo N95
- 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 ln
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste

**PNT.DNCC. INEN. 064 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN  
POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MLH1 V.01**

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

- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Papel bond 75 g tamaño A4
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 unidades
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 unidades
- Tips con filtro 1000 µL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 0.1 µL - 10 µL x 96 unidades
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Alcohol etílico (etanol) 98% x 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Primer MLH1 EX10 F: 5'-CCTGTGACCTCACCCC-3' X 1000 determinaciones
- Primer MLH1 EX10 R: 5'-GAGCCTGATAGAACATCTG-3' X 1000 determinaciones
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 unidades
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100 pb Ladder) x 250 µL
- Solución tampón (buffer) tris acetato - EDTA 10x x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000x x 200 µL
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Alcohol etílico (etanol) 98% x 2.5 L
- Kit de secuenciación Bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciación x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético ABI 3500

**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



**PNT.DNCC. INEN. 064 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MLH1 V.01**

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

**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 Desoxirribonucleico (ADN).

**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.

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

Basado en metodología descrita previamente 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.

**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 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 de sangre periférica.

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación**

Se realiza a partir de 200 µL 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/µL.



**PNT.DNCC. INEN. 064 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MLH1 V.01**

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

**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 a estudiar según antecedente familiar del gen MLH1 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 con electroforesis**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (TAE) que 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 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 a estudiar según antecedente familiar del gen MLH1, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación 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 µL).

**11.10 Secuenciamiento genético**

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero pop 7; luego se inicia la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para el gen a analizar.

**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 según bibliografía y protocolos internos.



**PNT.DNCC. INEN. 064 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MLH1 V.01**

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

**11.12 Elaboración y entrega de resultado**

El/la Biólogo/a encargado de la prueba analizará la secuencia del exón estudiado para determinar la presencia de la variante familiar y elaborará el resultado de la prueba, con esa información, el Médico Genetista a cargo evalúa el caso clínico y procede a presentarlo al grupo de trabajo (biólogos y médicos genetistas), luego se realizará la validación múltiple con por lo menos por 3 médicos genetistas y posterior impresión de resultado en formato interno.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Vasen HFA, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut*. 2013 Jun 1;62(6):812–23.
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931–45
3. Hegde M, Ferber M, Mao R, Samowitz W, Ganguly A, Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). *Genet Med*. 2014 Jan;16(1):101–16.
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):4

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC. INEN. 064 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MLH1 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	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN. 065 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MSH2 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 POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MSH2****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de detección por secuenciamiento de variante patogénica familiar en el gen MSH2.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81296
- Código Tarifario INEN: 210781

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de detección por secuenciamiento de variante patogénica familiar en el gen MSH2 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 válida los resultados impresos en físico.
- Biólogo/a 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**

- **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. 065 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MSH2 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 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.
- **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 – 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.
- **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.
- **Línea germinal.** - Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de búsqueda de variante patogénica y/o probablemente patogénica familiar en familiares de pacientes con diagnóstico molecular de Síndrome de Lynch o Espectro fenotípico asociado al gen MSH2 esta prueba sirve para identificar individuos portadores y definir estrategias de control de riesgos y reducción de riesgos en estos portadores

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos
- Vórtex Genie 2 mixer, color blanco humo
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Espectrofotómetro

**PNT.DNCC. INEN. 065 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MSH2 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
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador

**7.2 Instrumentales**

- Micropipeta volumen variable 0.5 µL -10 µL
- Micropipeta volumen variable 20 µL -200 µL
- Micropipeta volumen variable 2 µL – 20 µL
- Micropipeta volumen variable 100 µL – 20 µL

**7.3 Mobiliario**

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

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

- Mascarilla descartable tipo N95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 mL
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000
- Tips con filtro 1000 µL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 0.1 µL - 10 µL x 96 unidades



**PNT.DNCC. INEN. 065 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MSH2 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
- Alcohol etílico (etanol) 98% x 2.5 L
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Primer MSH2 EX6 F: 5'-GTTTTCACTAATGAGCTTGC-3' X 1000 determinaciones
- Primer MSH2 EX6 R: 5'-GTGGTATAATCATGTGGG-3' X 1000 determinaciones
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 unidades
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100 pb Ladder) x 250 µL
- Solución tampón (buffer) tris acetato - EDTA 10x x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000x x 200 µL
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciamiento Bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético ABI 3500

**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 Desoxirribonucleico (ADN).

**10.3. Recipiente**

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



**PNT.DNCC. INEN. 065 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MSH2 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**

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.

**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**

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

**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 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 de sangre periférica.

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación**

Se realiza a partir de 200 µL 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/µL.

**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 a estudiar según antecedente familiar del gen MSH2 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 con electroforesis:**

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. 065 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MSH2 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 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 Big Dye Terminator y primers específicos para la región de exón a estudiar según antecedente familiar del gen MSH2, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación 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 µL).

**11.10 Secuenciamiento genético**

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero pop 7; luego se inicia la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para el gen a analizar.

**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 según bibliografía (4) y protocolos internos.

**11.12 Elaboración y entrega de resultado**

El/la biólogo/a encargado de la prueba analizará la secuencia del exón estudiado para determinar la presencia de la variante familiar y elaborará el resultado de la prueba, con esa información, el médico genetista a cargo evalúa el caso clínico y procede a presentarlo al grupo de trabajo (biólogos y médicos genetistas), luego se realizará la validación múltiple con por lo menos por tres medios genetistas y posterior impresión de resultado en formato interno.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Vasen HFA, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. Gut. 2013 Jun 1;62(6):812–23.
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 2004 Oct 21;431(7011):931–45





**PNT.DNCC. INEN. 065 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MSH2 V.01**

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

3. Hegde M, Ferber M, Mao R, Samowitz W, Ganguly A, Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). Genet Med. 2014 Jan;16(1):101–16.
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):4

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC. INEN. 065 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN MSH2 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	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC. INEN. 066 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL EXON 23 DEL GEN DNMT3 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 POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL EXON 23 DEL GEN DNMT3****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de trabajo de Detección por Secuenciamiento de Mutaciones en el Exón 23 del Gen DNMT3.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81404.08
- Código Tarifario INEN: 210790

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección por Secuenciamiento de Mutaciones en el Exón 23 del Gen DNMT3 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/a 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/a 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.
- Médico Oncólogo del Departamento de Oncología Médica y Departamento de Oncología Pediátrica: se encargan de la toma de muestra por medio de aspirado de médula ósea.
- 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**

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

**PNT.DNCC. INEN. 066 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL EXON 23 DEL GEN DNMT3 V.01**

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

- **Punción de médula ósea.** - Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- **Muestra de sangre periférica.** - Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- **Solución anticoagulante.** - Solución que impide la coagulación de la sangre, evitando por tanto la formación de coágulos o impidiendo su crecimiento y favoreciendo su disolución (desaparición) en caso de que ya se hayan formado.
- **Ácido 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.
- **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.
- **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.

**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 (The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos.
- Microcentrífuga refrigerada
- Vórtex Genie 2 mixer, color blanco humo.
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Espectrofotómetro
- Termociclador
- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Cámara fotográfica digital

**PNT.DNCC. INEN. 066 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCIÓN  
POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL EXON 23 DEL GEN DNMT3 V.01**

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

- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador

**7.2 Instrumentales. -**

- Micropipeta volumen variable 0.5 µL - 10µL
- Micropipeta volumen variable 20 µL -200 µL
- Micropipeta volumen variable 2 µL – 20 µL
- Micropipeta volumen variable 100 µL – 20 µL

**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:**

- Mascarilla Descartable Tipo N95
- Guante Para Examen Descartable Talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° X 500 mL
- Algodón hidrófilo X 500 G
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 G X 1 In
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm X 9.1 m
- Gel antibacterial para manos X 1 L aprox.
- Papel toalla X 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán X 800 mL
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S
- Guardapolvo de dril para dama manga larga talla S
- Chaqueta de dril manga corta para caballero talla M color celeste
- Chaqueta de dril manga corta para dama talla S color celeste
- Pantalón dril unisex talla M color celeste
- Pantalón dril unisex talla S color celeste
- Contenedor de plástico de bioseguridad portátil de 950 mL
- Lentes protectores de policarbonato
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL X 500 unidades
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 mL X 1000 unidades
- Tips con filtro 1000 UI X 96 unidades
- Tips estéril con filtro 0.1 UI - 10 UI X 96 unidades
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Alcohol etílico (etanol) 98% x 2.5 L

**PNT.DNCC. INEN. 066 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL EXON 23 DEL GEN DNMT3 V.01**

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

- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro qubit x 100 determinaciones
- Primer DNMT3A F 5'-TCCTGCTGTGTGGTTAGACG-3'
- Primer DNMT3A R 5'-ACAGAAAACCCCTCTGAAAAG -3'
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 unidades
- Deoxinucleótidos dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100 pb Ladder) x 250 µL
- Solución tampón (buffer) tris acetato - EDTA 10x x 1 L
- Colorante para ácidos nucleicos (ADN) en gel de agarosa 10 000x x 200 µL
- Agarosa grado biología molecular x 500 g
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético abi 3500

**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: Es realizado por 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).



**PNT.DNCC. INEN. 066 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL EXON 23 DEL GEN DNMT3 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.  
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 y bibliografía actual 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.

**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 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 de sangre periférica y/o medula ósea.

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación:**

Se realiza a partir de 200 µL 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/µL.

**11.5 Amplificación de región de interés**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para el exón 23 del gen DNMT3 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

**PNT.DNCC. INEN. 066 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL EXÓN 23 DEL GEN DNMT3 V.01**

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

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

**11.6 Preparación del gen con electroforesis**

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 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 el exón 23 del gen DNMT3, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación 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 µL).

**11.10 Secuenciamiento genético**

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero pop 7; luego se inicia la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para las regiones a analizar.

**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 variantes a nivel del exón 23 del gen DNMT3 según bibliografía y protocolos internos.

**11.12 Elaboración y entrega de resultado**

El/la Biólogo/a encargado de la prueba analizará la secuencia del exón 23 para determinar la presencia de variantes por medio de "llamado de variantes" y elabora el resultado de la prueba, luego el médico genetista a cargo evalúa la "clasificación" de la variante encontrada y validará el resultado de la prueba.



**PNT.DNCC. INEN. 066 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCIÓN  
POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL EXON 23 DEL GEN DNMT3 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. 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. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931-45
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):4
5. Li, Marilyn M., Michael Datto, Eric J. Duncavage, Shashikant Kulkarni, Neal I. Lindeman, Somak Roy, Apostolia M. Tsimberidou, et al. «Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists». *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* 19, n.o 1 (2017): 4-23. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.002>.

**XIII. ANEXO**

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



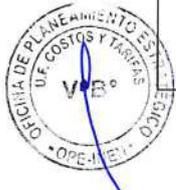


**PNT.DNCC. INEN. 066 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL EXON 23 DEL GEN DNMT3 V.01**

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	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC.INEN. 067 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXON 4 DEL  
GEN IDH1 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  
POR SECUENCIAMIENTO DEL EXON 4 DEL GEN IDH1****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de mutaciones por secuenciamiento del exón 4 del gen IDH1.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81404.01
- Código Tarifario INEN: 210775

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección de mutaciones por secuenciamiento del exón 4 del gen IDH1, 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados obtenidos en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ADN, amplificación por PCR, análisis de fragmento, 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.
- 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: se encarga de la revisión de láminas para colocar 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: se encarga de la toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica).
- 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.

**PNT.DNCC.INEN. 067 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXON 4 DEL  
GEN IDH1 V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**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, y 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.
- Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de trasmisión de genes y de 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.
- 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.
- Línea somática: Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores y material genético propio de la célula neoplásica
- 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.
- 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: Muestra de tejido biológico obtenida por diferentes métodos: raspado cervical o biopsia.
- Tejido parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN específico, para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Prueba utilizada para gradación de riesgo (pronóstico) y manejo de leucemias agudas de estirpe mieloide en pacientes pediátricos y adultos; así como diagnóstico y gradación de riesgo (pronóstico) en tumores del sistema nervioso central en pacientes pediátricos, según guías actuales (1).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II



**PNT.DNCC.INEN. 067 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXON 4 DEL  
GEN IDH1 V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Centrífuga para tubos
- Vortex Genie 2 Mixer, color blanco humo.
- Microcentrífuga refrigerada
- Espectrofotómetro
- Microtomo de rotación
- Termociclador
- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Computadora

**7.2 Instrumentales**

- Micropipeta volumen variable 0.5 uL – 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL – 200 uL
- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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

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

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 500 L
- Alcohol etílico (Etanol) 98 % x 2.5 L
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla S
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 mL



**PNT.DNCC.INEN. 067 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXON 4 DEL  
GEN IDH1 V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Mandilón descartable talla estándar
- Aguja hipodérmica descartable N° 21 g x 1 1/2 In
- Cuchilla descartable de perfil alto para microtomo de rotación x 50
- Hoja de bisturí descartable N° 22
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 unidades
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000 unidades
- Xilol Q.P. x 1 L
- Jeringa descartable de tuberculina 1 mL con aguja 26 g x 1/2 In
- Kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado x 50 reacciones
- Tips con filtro 1000 uL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 unidades
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- PRIMER IDH1.2 F: 5'-TGAGAAGAGGGTTGAGGAGTT-3'
- PRIMER IDH1.2 R: 5'-AACATGCAAAATCACATTATTGCC-3'
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 unidades
- Deoxinucleótidos Dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 uL
- Solución tampón (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
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético abi 3500



**PNT.DNCC.INEN. 067 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXON 4 DEL  
GEN IDH1 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: es realizado por el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula Ósea: es realizado por el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica
- Tejido embebido en parafina (TEEP): es realizado por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología
- Tejido fresco: es realizado por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN) viral.

**10.3. Recipiente:**

- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula Ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio
- Tejido fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de 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.
- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente.

**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. 067 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXON 4 DEL  
GEN IDH1 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: es realizado por el personal técnico del Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula Ósea: es realizado 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 embebido en parafina (TEEP): muestra obtenida del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.
- Tejido fresco: muestra obtenida por procedimiento realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

**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 Revisión de láminas:**

Realizado por el Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia, debe definir regiones con más 10 % de carga tumoral.

**11.4 Cortes de tejido:**

Luego de identificar la región a estudiar, se realiza por lo menos 5 cortes de 1-1.5 u del bloque de parafina, material que será colocado en un tubo de 1.5 mL para el siguiente paso.

**11.5 Desparafinización de la muestra:**

Los cortes en los tubos de 1.5 mL se someten a una batería de alcoholes (Xilol) para realizar la desparafinización.

**11.6 Aislamiento de ADN:**

Se realiza a partir del tejido desparafinado por medio del kit de extracción de ADN genómico y por método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante; los pellets obtenidos contienen el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer.

**11.7 Extracción y cuantificación de ADN:**

Se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro.

**11.8 Reacción en cadena de polimerasa:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio de uso de primers específicos para el exón 4 del gen IDH1 por medio del uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq ADN polimerasa termiactivable de alta fidelidad) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.



**PNT.DNCC.INEN. 067 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXON 4 DEL  
GEN IDH1 V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.9 Sistema de electroforesis horizontal:**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (TAE) que ayuda 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 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 el exón 4 del gen IDH1, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación 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. 90-100uL).

**11.13 Secuenciamiento genético:**

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero Pop 7; luego se da inicio a la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para las regiones a analizar.

**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 (Alineamiento) y se comparan ambas secuencias en el software BioEdit para definir la presencia/ausencia de variantes a nivel del exón 4 del gen IDH1 según bibliografía (3)(4) y protocolos internos.

**11.15 Elaboración y entrega de resultado:**

El Biólogo encargado de la prueba analiza la secuencia del exón 23 para determinar la presencia de variantes por medio de "llamado de variantes" y elabora el resultado de la prueba, luego el Médico Genetista a cargo evalúa la "clasificación" de la variante encontrada y validará el resultado de la prueba.

**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. 2016 Jun;131(6):803–20.



**PNT.DNCC.INEN. 067 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXON 4 DEL GEN IDH1 V.01**

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

2. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 2004 Oct 21;431(7011):931–45
3. 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):4
4. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J Mol Diagn. 2017;19(1):4–23.



**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC.INEN. 067 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXON 4 DEL GEN IDH1 V.01**

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

**ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 - 9	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN.	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez







**PNT.DNCC.INEN. 068 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 4 DEL  
GEN IDH2 - 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  
POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 4 DEL GEN IDH2**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de mutaciones por secuenciamiento del exón 4 del gen IDH2.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81404.02
- Código Tarifario INEN: 210776

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección de mutaciones por secuenciamiento del exón 4 del gen IDH2, 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados obtenidos en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción y cuantificación de ADN, amplificación por PCR, análisis de fragmento, 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.
- 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: se encarga de la revisión de láminas para colocar 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: se encarga de la toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica).
- 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.



**PNT.DNCC.INEN. 068 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 4 DEL  
GEN IDH2 - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**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, y 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.
- Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de transmisión de genes y de 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.
- 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 – 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.
- Línea somática: Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores y material genético propio de la célula neoplásica
- 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: Muestra de tejido biológico obtenida por diferentes métodos: raspado cervical o biopsia.
- Tejido parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Prueba utilizada para gradación de riesgo (pronóstico) y manejo de leucemias agudas de estirpe mieloide en pacientes pediátricos y adultos; así como diagnóstico y gradación de riesgo (pronóstico) en tumores del sistema nervioso central en pacientes pediátricos, según guías actuales (1).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II





**PNT.DNCC.INEN. 068 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 4 DEL  
GEN IDH2 - V.01**

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

- Centrífuga para tubos
- Vortex Genie 2 Mixer, color blanco humo.
- Espectrofotómetro
- Microtomo de rotación
- Termociclador
- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Computadora

### 7.2 Instrumentales

- Micropipeta volumen variable 0.5 uL – 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL – 200 uL
- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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

## VIII. SUMINISTROS

### 8.1 Insumos y material:

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (Etanol) 98 % x 2.5 L
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla S
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Tacho de plástico 25 L aprox.



**PNT.DNCC.INEN. 068 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 4 DEL  
GEN IDH2 - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Mandilón descartable talla estándar
- Aguja hipodérmica descartable N° 21 G x 1 1/2 In
- Cuchilla descartable de perfil alto para microtomo de rotación x 50 unidades
- Hoja de bisturí descartable N° 22
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 unidades
- Xilol Q.P. x 1 L
- Jeringa descartable de tuberculina 1 mL con aguja 26 g x 1/2 In
- Kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado x 50 reacciones
- Tips con filtro 1000 uL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 unidades
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- PRIMER IDH2.2 F: 5'-TGAGAAGAGGGTTGAGGAGTT-3'
- PRIMER IDH2.2 R: 5'-AACATGCAAAATCACATTATTGCC-3'
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 unidades
- Deoxinucleótidos Dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 uL
- Solución tampón (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
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético abi 3500

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

**PNT.DNCC.INEN. 068 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 4 DEL  
GEN IDH2 - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

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: es realizado por el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula Ósea: es realizado por el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica
- Tejido embebido en parafina (TEEP): es realizado por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología
- Tejido fresco: es realizado por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN) viral.

**10.3. Recipiente:**

- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Medula Ósea: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Tejido fresco: frasco estéril y cloruro de sodio 9/1000.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de 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.
- Tejido fresco: iniciar el proceso inmediatamente.

**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. 068 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 4 DEL  
GEN IDH2 - 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: es realizado por el personal técnico del Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula Ósea: es realizado 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 embebido en parafina (TEEP): muestra obtenida del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.
- Tejido fresco: muestra obtenida por procedimiento realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

**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 Revisión de láminas:**

Realizado por el Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia, debe definir regiones con más 10 % de carga tumoral.

**11.4 Cortes de tejido:**

Luego de identificar la región a estudiar, se realiza por lo menos 5 cortes de 1-1.5 u del bloque de parafina, material que será colocado en un tubo de 1.5 mL para el siguiente paso.

**11.5 Desparafinización de la muestra:**

Los cortes en los tubos de 1.5 mL se someten a una batería de alcoholes (Xilol) para realizar la desparafinización.

**11.6 Aislamiento de ADN**

Se realiza a partir del tejido desparafinado por medio del kit de extracción de ADN genómico y por método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante; los pellets obtenidos contienen el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer.

**11.7 Extracción y cuantificación de ADN:**

Se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro.

**11.8 Reacción en cadena de polimerasa:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio de uso de primers específicos para el exón 4 del gen IDH2 por medio del uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq ADN polimerasa termiactivable de alta fidelidad) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.



**PNT.DNCC.INEN. 068 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 4 DEL  
GEN IDH2 - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.9 Sistema de electroforesis horizontal:**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (TAE) que ayuda 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 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 el exón 4 del gen IDH2, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación 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. 90-100 uL).

**11.13 Secuenciamiento genético:**

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero Pop 7; luego se da inicio a la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para las regiones a analizar.

**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 (Alineamiento) y se comparan ambas secuencias en el software BioEdit para definir la presencia/ausencia de variantes a nivel del exón 4 del gen IDH2 según bibliografía (3)(4) y protocolos internos.

**11.15 Elaboración y entrega de resultado:**

El Biólogo encargado de la prueba analiza la secuencia del exón 23 para determinar la presencia de variantes por medio de "llamado de variantes" y elabora el resultado de la prueba, luego el Médico Genetista a cargo evalúa la "clasificación" de la variante encontrada y valida el resultado de la prueba.

**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. 2016 Jun;131(6):803-20.



**PNT.DNCC.INEN. 068 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 4 DEL GEN IDH2 - V.01**

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

2. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 2004 Oct 21;431(7011):931-45
3. 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):4
4. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J Mol Diagn. 2017;19(1):4-23.



**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC.INEN. 068 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 4 DEL GEN IDH2 - V.01**

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

**ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 - 9	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN.	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez





**PNT.DNCC.INEN. 069 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 9, 11, 13 Y 17 DEL  
GEN CKIT (GIST u otros) - 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 POR  
SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 9, 11, 13 Y 17 DEL GEN CKIT (GIST u otros)****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección por secuenciamiento de los exones 9, 11, 13 y 17 del gen CKIT (GIST u otros).

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81404.06
- Código Tarifario INEN: 210777

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección por secuenciamiento de los exones 9, 11, 13 y 17 del gen CKIT (GIST u otros), 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados obtenidos en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar 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.
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: se encarga de la revisión de láminas para colocar 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: se encarga de la toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica).
- 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, y 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. 069 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 9, 11, 13 Y 17 DEL  
GEN CKIT (GIST u otros) - 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 de 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.
- 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 – 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.
- Línea somática: Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores y material genético propio de la célula neoplásica
- 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: Muestra de tejido biológico obtenida por diferentes métodos: raspado cervical o biopsia.
- Tejido parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.
- 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 búsqueda de variantes en los exones 9, 11, 13 y 17 del gen CKIT, utilizado para diagnóstico y gradación de riesgo (pronóstico) y uso de terapias target (inhibidores tirosino quinasa) en tumores del estroma gastrointestinal (GIST), melanoma y otras neoplasias en pacientes pediátricos y adultos, según guías actuales (1).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos
- Vortex Genie 2 Mixer, color blanco humo.
- Espectrofotómetro
- Microtomo de rotación
- Termociclador





**PNT.DNCC.INEN. 069 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 9, 11, 13 Y 17 DEL  
GEN CKIT (GIST u otros) - V.01**

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

- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Computadora



### 7.2 Instrumentales

- Micropipeta volumen variable 0.5 uL – 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL – 200 uL
- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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

## VIII. SUMINISTROS

### 8.1 Insumos y material:

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (Etanol) 98 % x 2.5 L
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla S
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Mandilón descartable talla estándar
- Aguja hipodérmica descartable Nº 21 G x 1 1/2 In
- Hoja de bisturí descartable Nº 22
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 unidades
- Xilol Q.P. x 1 L



**PNT.DNCC.INEN. 069 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 9, 11, 13 Y 17 DEL  
GEN CKIT (GIST u otros) - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Jeringa descartable de tuberculina 1 mL con aguja 26 g x 1/2 In
- Kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado x 50 reacciones
- Tips con filtro 1000 uL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 unidades
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- Primer C-KIT EXON 9 F: 5'- TCCTAGAGTAAGCCAGGGCTT-3' X 1000 Determinaciones
- Primer C-KIT EXON 9 R: 5'- TGGTAGACAGAGCCTAAACATCC-3' X 1000 Determinaciones
- Primer C-KIT EXON 11 F: 5'-GTGCTCTAATGACTGAGAC-3' X 1000 Determinaciones
- Primer C-KIT EXON 11 R: 5'- TACCCAAAAGGTGACATGG-3' X 1000 Determinaciones
- Primer C-KIT EXON 13 F: 5'- GACATCAGTTTGCCAGTTGT-3' X 1000 Determinaciones
- Primer C-KIT EXON 13 R: 5'- TGTTTTGATAACCTGACAGAC-3' X 1000 Determinaciones
- Primer C-KIT EXON 17 F: 5'- ATGGTTTTCTTTTCTCCTCC-3' X 1000 Determinaciones
- Primer C-KIT EXON 17 R: 5'- TACATTATGAAAATCACAGG-3' X 1000 Determinaciones
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 unidades
- Deoxinucleótidos Dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 uL
- Solución tampón (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
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades



**PNT.DNCC.INEN. 069 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 9, 11, 13 Y 17 DEL  
GEN CKIT (GIST u otros) - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Arreglo de 8 capilares para analizador genético abi 3500

**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 embebido en parafina (TEEP): es realizado por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología
- Tejido fresco: es realizado por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN).

**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 (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 embebido en parafina (TEEP): muestra obtenida del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.
- Tejido fresco: muestra obtenida por procedimiento realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

**PNT.DNCC.INEN. 069 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 9, 11, 13 Y 17 DEL  
GEN CKIT (GIST u otros) - 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 Revisión de láminas:**

Realizado por el Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia, debe definir regiones con más 10 % de carga tumoral.

**11.4 Cortes de tejido:**

Luego de identificar la región a estudiar, se realiza por lo menos 5 cortes de 1-1.5 u del bloque de parafina, material que será colocado en un tubo de 1.5 mL para el siguiente paso.

**11.5 Desparafinización de la muestra:**

Los cortes en los tubos de 1.5 mL se someten a una batería de alcoholes (Xilol) para realizar la desparafinización.

**11.6 Aislamiento de ADN:**

Se realiza a partir del tejido desparafinado por medio del kit de extracción de ADN genómico y por método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante; los pellets obtenidos contienen el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer.

**11.7 Extracción y cuantificación de ADN:**

Se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro.

**11.8 Reacción en cadena de polimerasa:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio de uso de primers específicos para los exones 9, 11, 13 y 17 del gen CKIT por medio del 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 el producto amplificado de la región específica.

**11.9 Sistema de electroforesis horizontal:**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (TAE) que ayuda 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 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 exones 9, 11, 13 y 17 del gen CKIT, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación por medio de ciclos de calor.





**PNT.DNCC.INEN. 069 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 9, 11, 13 Y 17 DEL  
GEN CKIT (GIST u otros) - V.01**

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

**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. 90-100uL).

**11.13 Secuenciamiento genético:**

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero Pop 7; luego se da inicio a la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para las regiones a analizar.

**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 (Alineamiento) y se comparan ambas secuencias en el software BioEdit para definir la presencia/ausencia de variantes a nivel de los exones 9, 11, 13 y 17 del gen CKIT según bibliografía (3)(4) y protocolos internos.

**11.15 Elaboración y entrega de resultado:**

El Biólogo encargado de la prueba analiza la secuencia del exón 23 para determinar la presencia de variantes por medio de "llamado de variantes" y elabora el resultado de la prueba, luego el Médico Genetista a cargo evalúa la "clasificación" de la variante encontrada y valida el resultado de la prueba.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Casali PG, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, Bielack S, et al. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2018 01;29(Suppl 4):iv68–78.
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 2004 Oct 21;431(7011):931–45
3. 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):4
4. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J Mol Diagn. 2017;19(1):4–23.

**XIII. ANEXO**

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



**PNT.DNCC.INEN. 069 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 9, 11, 13 Y 17 DEL GEN CKIT (GIST u otros) - V.01**

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

**ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 - 8	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN.	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC.INEN. 070 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 12, 14 y 18 DEL GEN  
PDGFRa (GIST u otros) - 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 POR  
SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 12, 14 y 18 DEL GEN PDGFRa (GIST u otros)****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección por secuenciamiento de los exones 12, 14 y 18 del gen PDGFRa (GIST u otros).

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSa): 81404.05
- Código Tarifario INEN: 210778

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección por secuenciamiento de los exones 12, 14 y 18 del gen PDGFRa (GIST u otros), 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados obtenidos en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar 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.
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: se encarga de la revisión de láminas para colocar 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: se encarga de la toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica).
- 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, y 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. 070 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 12, 14 y 18 DEL GEN  
PDGFRA (GIST u otros) - 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 de síntesis de proteínas.
- Análisis de secuenciamento: 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.
- 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 – 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.
- Línea somática: Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores y material genético propio de la célula neoplásica
- 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: Muestra de tejido biológico obtenida por diferentes métodos: raspado cervical o biopsia.
- Tejido parafinado (tejido embebido en parafina): Tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural.
- 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 búsqueda de variantes en los exones 12, 14 y 18 del gen PDGFRA, utilizado para diagnóstico y gradación de riesgo (pronóstico) y uso de terapias target (inhibidores tirosino kinasa) en tumores del estroma gastrointestinal (GIST) y otras neoplasias en pacientes pediátricos y adultos, según guías actuales (1).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos
- Vortex Genie 2 Mixer, color blanco humo.
- Espectrofotómetro
- Microtomo de rotación
- Termociclador





**PNT.DNCC.INEN. 070 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 12, 14 y 18 DEL GEN  
PDGFRa (GIST u otros) - V.01**

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

- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Computadora

### 7.2 Instrumentales

- Micropipeta volumen variable 0.5 uL – 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL – 200 uL
- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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

## VIII. SUMINISTROS

### 8.1 Insumos y material:

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (Etanol) 98 % x 2.5 L
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla S
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Mandilón descartable talla estándar
- Aguja hipodérmica descartable N° 21 G x 1 1/2 In
- Hoja de bisturí descartable N° 22
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 unidades
- Xilol Q.P. x 1 L





**PNT.DNCC.INEN. 070 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 12, 14 y 18 DEL GEN  
PDGRFa (GIST u otros) - V.01**

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

- Jeringa descartable de tuberculina 1 mL con aguja 26 g x 1/2 In
- Kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado x 50 reacciones
- Tips con filtro 1000 uL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 unidades
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- Primer PDGRFa EXON 12 F: 5'- TCCAGTCACTGTGCTGCTTC-3' X 1000 Determinaciones
- Primer PDGRFa EXON 12 R: 5'- GCAAGGGAAAAGGGAGTCTT-3' X 1000 Determinaciones
- Primer PDGRFa EXON 14 F: 5'- CAGGAAGTTGGTAGCTCAGC-3' X 1000 Determinaciones
- Primer PDGRFa EXON 14 R: 5'- CCAGTGAAAATCCTCACTCCA-3' X 1000 Determinaciones
- Primer PDGRFa EXON 18 F: 5'- ACCATGGATCAGCCAGTCTT-3' X 1000 Determinaciones
- Primer PDGRFa EXON 18 R: 5'- TGAAGGAGGATGAGCCTGACC-3' X 1000 Determinaciones
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 unidades
- Deoxinucleótidos Dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 uL
- Solución tampón (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
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético abi 3500





**PNT.DNCC.INEN. 070 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 12, 14 y 18 DEL GEN  
PDGFRa (GIST u otros) - 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:

- Tejido embebido en parafina (TEEP): es realizado por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología
- Tejido fresco: es realizado por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

### 10.2. Sistema biológico:

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN).

### 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.

## 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:

### 11.1 Toma de muestra:

- Tejido embebido en parafina (TEEP): muestra obtenida del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.
- Tejido fresco: muestra obtenida por procedimiento realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

### 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 Revisión de láminas:



**PNT.DNCC.INEN. 070 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 12, 14 y 18 DEL GEN  
PDGFRa (GIST u otros) - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

Realizado por el Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia, debe definir regiones con más 10 % de carga tumoral.

**11.4 Cortes de tejido:**

Luego de identificar la región a estudiar, se realiza por lo menos 5 cortes de 1-1.5 u del bloque de parafina, material que será colocado en un tubo de 1.5 mL para el siguiente paso.

**11.5 Desparafinización de la muestra:**

Los cortes en los tubos de 1.5 mL se someten a una batería de alcoholes (Xilol) para realizar la desparafinización.

**11.6 Aislamiento de ADN:**

Se realiza a partir del tejido desparafinado por medio del kit de extracción de ADN genómico y por método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante; los pellets obtenidos contienen el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer.

**11.7 Extracción y cuantificación de ADN:**

Se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro.

**11.8 Reacción en cadena de polimerasa:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio de uso de primers específicos para los exones 12, 14 y 18 del gen PDGFRa por medio del 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 el producto amplificado de la región específica.

**11.9 Sistema de electroforesis horizontal:**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (TAE) que ayuda 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 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 exones 12, 14 y 18 del gen PDGFRa, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación 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. 90-100uL).

**11.13 Secuenciamiento genético:**



**PNT.DNCC.INEN. 070 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 12, 14 y 18 DEL GEN  
PDGFRa (GIST u otros) - V.01**

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

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero Pop 7; luego se da inicio a la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para las regiones a analizar.

**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 (Alineamiento) y se comparan ambas secuencias en el software BioEdit para definir la presencia/ausencia de variantes a nivel de los exones 12, 14 y 18 del gen PDGFRa según bibliografía (3)(4) y protocolos internos.

**11.15 Elaboración y entrega de resultado:**

El Biólogo encargado de la prueba analiza la secuencia del exón 23 para determinar la presencia de variantes por medio de "llamado de variantes" y elabora el resultado de la prueba, luego el Médico Genetista a cargo evalúa la "clasificación" de la variante encontrada y valida el resultado de la prueba.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Casali PG, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, Bielack S, et al. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2018 01;29(Suppl 4):iv68–78.
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004 Oct 21;431(7011):931–45
3. 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):4
4. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19(1):4–23.

**XIII. ANEXO**

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



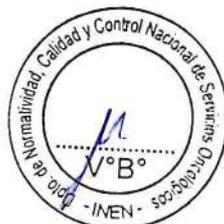


**PNT.DNCC.INEN. 070 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 12, 14 y 18 DEL GEN PDGFRa (GIST u otros) - V.01**

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

**ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 – 8	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN.	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC.INEN. 071 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL GEN CEBPA -  
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 POR  
SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL GEN CEBPA****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección por secuenciamiento de mutaciones en el gen CEBPA.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81404.09
- Código Tarifario INEN: 210788

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección por secuenciamiento de mutaciones en el gen CEBPA, 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados obtenidos en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar 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.
- 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
- 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, y 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. 071 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL GEN CEBPA -  
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 de síntesis de proteínas.
- 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 (1).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrifuga para tubos
- Microcentrifuga refrigerada
- Vortex Genie 2 Mixer, color blanco humo.
- Espectrofotómetro
- Microtomo de rotación
- Termociclador
- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Computadora



**PNT.DNCC.INEN. 071 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL GEN CEBPA -  
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 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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

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

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (Etanol) 98 % x 2.5 L
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Mascarilla descartable Tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- 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.
- 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
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000

**PNT.DNCC.INEN. 071 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL GEN CEBPA -  
V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tips con filtro 1000 uL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 unidades
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- Primer CEBPA A-F 5'-GGCGAGCAGGGTCTCCGGGT-3'
- Primer CEBPA A-R 5'-TGTGCTGGAACAGGTCGGCCA-3'
- Primer CEBPA B-F 5'-GCTGGGCGGCATCTGCGA-3'
- Primer CEBPA B-R 5'-CCCCGACGCGCTCGTACAGG-3'
- Primer CEBPA C-F 5'-CCGGCTACCTGGACGGCAGG-3'
- Primer CEBPA C-R 5'-CGTTGCTGTTCTTGTCCACCGACTTCTT-3'
- Primer CEBPA D-F 5'-CTCGGTGCCGCGGCCT-3'
- Primer CEBPA D-R 5'-AACCACTCCCTGGGTCCCCGC-3'
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 unidades
- Deoxinucleótidos Dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 uL
- Solución tampón (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
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético abi 3500

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

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado





**PNT.DNCC.INEN. 071 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL GEN CEBPA -  
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: es realizado por el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula Ósea: es realizado por el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y 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.

**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:

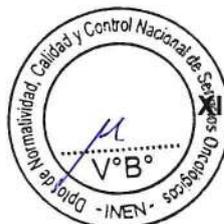
**11.1 Toma de muestra:**

- Sangre venosa: es realizado por el personal técnico del Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula Ósea: es realizado 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:**



**PNT.DNCC.INEN. 071 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL GEN CEBPA -  
V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

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

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación:**

Se realiza a partir de 200 uL de sangre total y/o médula 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/uL.

**11.5 Amplificación de región de interés:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para los 4 fragmentos del gen CEBPA 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 Preparación del gen con electroforesis:**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (TAE) que ayuda 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 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:**

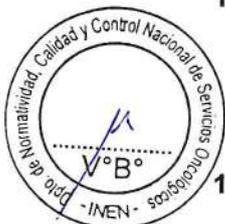
Los productos de la purificación son procesados con el Kit de secuenciamiento BigDye Terminator y primers específicos para los 4 fragmentos del gen CEBPA, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación por medio de ciclos de calor.

**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, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero Pop 7; luego se da inicio a la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para las regiones a analizar.





**PNT.DNCC.INEN. 071 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL GEN CEBPA -  
V.01**

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

**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 variantes a nivel de los 4 fragmentos del gen CEBPA según bibliografía (3)(4) y protocolos internos.

**11.12 Elaboración y entrega de resultado:**

El Biólogo encargado de la prueba analiza la secuencia genética para determinar la presencia de variantes por medio de "llamado de variantes" y elabora el resultado de la prueba, luego el Médico Genetista a cargo evalúa la "clasificación" de la variante encontrada y valida el resultado de la prueba.

**XII. 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. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004 Oct 21;431(7011):931-45
3. 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):4
4. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19(1):4-23.

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC.INEN. 071 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE MUTACIONES EN EL GEN CEBPA - V.01**

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

**ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 - 8	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN).	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC.INEN. 072 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN FLT3-D835 - 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 LA MUTACIÓN  
FLT3-D835****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de la mutación FLT3-D835.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81404.07
- Código Tarifario INEN: 210789

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección de la mutación FLT3-D835, 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados obtenidos en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar 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.
- 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
- 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, y 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. 072 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN FLT3-D835 - 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 de síntesis de proteínas.
- 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.
- 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)(2).

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos
- Microcentrífuga refrigerada
- Vortex Genie 2 Mixer, color blanco humo.
- Espectrofotómetro
- Microtomo de rotación
- Termociclador
- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador



**PNT.DNCC.INEN. 072 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN FLT3-D835 - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Computadora

**7.2 Instrumentales**

- Micropipeta volumen variable 0.5 uL – 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL – 200 uL
- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 uL

**7.3 Mobiliario**

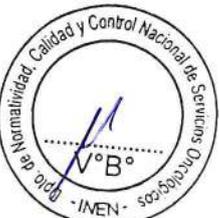
- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal
- Silla de escritorio giratoria rodante
- Módulo para computadora enchapado en melamine

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

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 500 MI
- Alcohol etílico (Etanol) 98% x 2.5 L
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Mascarilla descartable Tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- 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.
- 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

**PNT.DNCC.INEN. 072 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN FLT3-D835 - 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
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000
- Tips con filtro 1000 uL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 unidades
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- PRIMER FLT3-TKD F 5'-AAGAACTGCAGCCACCATAGC -3'
- PRIMER FLT3-TKD R 5'-AAGAACTGCAGCCACCATAGC -3'
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 unidades
- Deoxinucleótidos Dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 uL
- Solución tampón (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
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético abi 3500

**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



**PNT.DNCC.INEN. 072 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN FLT3-D835 - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Luz
- Teléfono

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

- Sangre venosa: es realizado por el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula Ósea: es realizado por el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y 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:

**11.1 Toma de muestra:**

- Sangre venosa: es realizado por el personal técnico del Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula Ósea: es realizado 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 nivel de bioseguridad II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de

**PNT.DNCC.INEN. 072 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN FLT3-D835 - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o médula ósea.

**11.4 Extracción de ADN y cuantificación:**

Se realiza a partir de 200 uL de sangre total y/o médula 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/uL.

**11.5 Amplificación de región de interés:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio del uso de primers específicos para los 4 fragmentos del gen CEBPA 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 Preparación del gen con electroforesis:**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (TAE) que ayuda 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 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 el fragmento que contiene la variante FLT3-D835, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación 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, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero Pop 7; luego se da inicio a la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para las regiones a analizar.

**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



**PNT.DNCC.INEN. 072 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN FLT3-D835 - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

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 FLT3-D835 según bibliografía (4)(5) y protocolos internos

**11.12 Elaboración y entrega de resultado:**

El Biólogo encargado de la prueba analiza la secuencia del exón 23 para determinar la presencia de variantes por medio de "llamado de variantes" y elabora el resultado de la prueba, luego el Médico Genetista a cargo evalúa la "clasificación" de la variante encontrada y valida el resultado de la prueba

**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. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931-45
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):4
5. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):4-23.

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC.INEN. 072 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN FLT3-D835 - V.01**

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

**ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 – 8	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN.	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC.INEN. 073 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS- 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 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS  
NUCLÉICOS****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Extracción de ácidos nucleicos.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSa): 81891.03
- Código Tarifario INEN: 210791

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Extracción de ácidos nucleicos, 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:

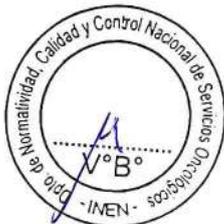
- Médico Genetista del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados obtenidos en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar 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.
- 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: se encarga de la revisión de láminas para colocar 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: se encarga de la toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica).
- 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, y es responsable de su transmisión hereditaria.

**PNT.DNCC.INEN. 073 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS- V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- 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.
- Ácido Ribonucleico (ARN): Es una macromolécula que ayuda al ADN en las funciones de transmisión de genes y de síntesis de proteínas.
- 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.
- 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 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: muestra tomada por proceso de biosia no embebido en parafina.
- Tejido parafinado (tejido embebido en parafina): tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Prueba utilizada para la obtención de ácidos nucleicos: ADN ó ARN según necesidad y su posterior cuantificación.

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Centrífuga para tubos
- Microcentrífuga refrigerada
- Vortex Genie 2 Mixer, color blanco humo.
- Espectrofotómetro
- Congeladora de metal, color plomo
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco



**PNT.DNCC.INEN. 073 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS- V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Computadora

**7.2 Instrumentales**

- Micropipeta volumen variable 0.5 uL – 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL – 200 uL
- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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:**

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 500 MI
- Alcohol etílico (Etanol) 98% x 2.5 L
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Mascarilla descartable Tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- 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.
- 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

**PNT.DNCC.INEN. 073 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS- 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
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 mL x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 mL x 1000
- Tips con filtro 1000 uL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 unidades
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones

**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: es realizado por el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula Ósea: es realizado por el Equipo Funcional de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica de Adultos del Departamento de Oncología Médica y el Equipo Funcional de Servicio de Procedimientos Especiales de Medicina Oncológica Pediátrica del Departamento de Oncología Pediátrica.
- Líquidos orgánicos: es realizado por 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): es realizado por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología
- Tejido fresco: es realizado por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN)/Ácido ribonucleico (ARN).

**10.3. Recipiente:**

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

**PNT.DNCC.INEN. 073 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS- V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- 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:**

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

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

Basado en metodología descrita por bibliografía actual 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: es realizado por el personal técnico del Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.
- Médula Ósea: es realizado 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: es realizado 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 embebido en parafina (TEEP): muestra obtenida del área de conservación del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.
- Tejido fresco: muestra obtenida por procedimiento realizado por el Médico Cirujano Oncólogo de los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

**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 nivel de bioseguridad II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica y/o médula ósea.



**PNT.DNCC.INEN. 073 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS- 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 ADN y cuantificación:**

Se realiza a partir de 200 uL de sangre total y/o médula 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/uL.

**11.5 Análisis de resultado:**

El Biólogo encargado de la prueba elabora el resultado, el cual será validado por el Médico Genetista.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Ali, Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics BioMed Research International 2017.

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC.INEN. 073 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS- V.01**

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

**ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 - 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).	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez







**PNT.DNCC.INEN. 074 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL DE DETECCIÓN DE VARIANTES EN GENES ASOCIADOS A  
SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A CÁNCER POR  
SECUENCIAMIENTO DE SIGUIENTE GENERACIÓN - 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  
VARIANTES EN GENES ASOCIADOS A SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A  
CÁNCER POR SECUENCIAMIENTO DE SIGUIENTE GENERACIÓN**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Panel de detección de variantes en genes asociados a síndromes de predisposición genética a cáncer por secuenciamiento de siguiente generación.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81479.10
- Código Tarifario INEN: 210792

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Panel de detección de variantes en genes asociados a síndromes de predisposición genética a cáncer por secuenciamiento de siguiente generación, 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado, realizar la revisión del caso, clasificar las variantes halladas y validar los resultados impresos en físico.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, extracción de ADN, secuenciamiento genómico de siguiente generación, electroforesis, análisis de resultado (llamado de variantes) y emisión de resultados.
- 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.

**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, y 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. 074 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL DE DETECCIÓN DE VARIANTES EN GENES ASOCIADOS A  
SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A CÁNCER POR  
SECUENCIAMIENTO DE SIGUIENTE GENERACIÓN - 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.
- 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.
- Línea germinal: Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN.
- Secuenciamiento de siguiente generación: Secuenciación de alto rendimiento, conjunto de técnicas de secuenciación genéticas masivas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) de múltiples genes en paralelo.



## VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Este estudio está indicado para la identificación de variantes patogénicas y probablemente patogénicas en pacientes con criterios clínicos de sospecha de síndromes de predisposición genética asociada a cáncer y de esa manera definir estrategias de control de riesgos y reducción de riesgos en el manejo de estos pacientes según guías clínicas, así como identificar familiares portadores de alto riesgo genético a cáncer (1).



## VII. EQUIPAMIENTO

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

- Cámara de flujo laminar, clase II
- Equipo baño maria de calor seco
- Vortex Genie 2 Mixer
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Micrótopo de rotación
- Analizador genético de siguiente generación
- Termociclador
- Cámara Fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Computadora





**PNT.DNCC.INEN. 074 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL DE DETECCIÓN DE VARIANTES EN GENES ASOCIADOS A  
SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A CÁNCER POR  
SECUENCIAMIENTO DE SIGUIENTE GENERACIÓN - 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 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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

## VIII. SUMINISTROS

### 8.1 Insumos y material:

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 500 mL
- Alcohol etílico (Etanol) 98% x 2.5 L
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 G x 1 In
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Mascarilla descartable Tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- 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
- Lentes protectores de policarbonato
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones





**PNT.DNCC.INEN. 074 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL DE DETECCIÓN DE VARIANTES EN GENES ASOCIADOS A  
SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A CÁNCER POR  
SECUENCIAMIENTO DE SIGUIENTE GENERACIÓN - 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 microcentrífuga de 1.5 mL x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrífuga de 0.5 mL x 1000
- Tips con filtro 1000 uL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 uL
- Solución tampón (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
- Puntera (tips) estéril 0.1 uL - 10 uL x 96 en rack
- Kit de panel de secuenciamiento de siguiente generación para genes asociados a predisposición genética a cáncer



## 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: es realizado por el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.

### 10.2. Sistema biológico:

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN).

### 10.3. Recipiente:

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

### 10.4. Conservación y manejo:





**PNT.DNCC.INEN. 074 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL DE DETECCIÓN DE VARIANTES EN GENES ASOCIADOS A  
SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A CÁNCER POR  
SECUENCIAMIENTO DE SIGUIENTE GENERACIÓN - V.01**

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

- 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 (1) (2), protocolo descrito en el inserto 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: es realizado por el personal técnico del Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.

### 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 nivel de bioseguridad 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 y cuantificación de ADN:

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, los pellets obtenidos contienen 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.

### 11.5 Electroforesis de ADN genómico

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (TAE) para analizar la calidad del material extraído, por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

### 11.6 Secuenciamiento de siguiente generación:

Se realiza por medio de uso de Kit de panel de secuenciamiento de siguiente generación para genes asociados a predisposición genética a cáncer, incluye los pasos siguientes:

- Preparación de Bibliotecas: marcado y limpieza de ADN genómico, se fragmenta el ADN genómico y se añaden secuencias de adaptadores a los extremos de cada fragmento, el proceso de limpieza purifica los fragmentos marcados.
- Primera amplificación PCR: amplifica los fragmentos marcados y añade las secuencias del índice 1 (i7) y el índice 2 (i5); así como los adaptadores comunes (P5 y P7) que son sometidos a amplificación por medio de ciclos de calor, en este paso se configuran los cebadores de índice y se realiza la limpieza de PCR por medio de perlas de purificación para eliminar los productos no deseados.





**PNT.DNCC.INEN. 074 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
PANEL DE DETECCIÓN DE VARIANTES EN GENES ASOCIADOS A  
SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A CÁNCER POR  
SECUENCIAMIENTO DE SIGUIENTE GENERACIÓN - V.01**

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

- Primera hibridación: este proceso mezcla la biblioteca de ADN con sondas de captura en regiones objetivo de interés.
- Primera captura: por medio de perlas de estreptavidina para capturar sondas hibridadas en regiones objetivo de interés. Por procedimientos de lavado y calor se eliminan los productos que no se unieron específicamente a las perlas; luego la biblioteca enriquecida se eluye de las perlas.
- Segunda hibridación: este proceso combina la biblioteca de ADN eluida de la primera ronda de enriquecimiento con sondas de captura adicionales en regiones objetivo de interés. Esta segunda hibridación es necesaria para garantizar la alta especificidad de las regiones capturadas.
- Segunda captura: este proceso emplea perlas de estreptavidina para capturar sondas hibridadas en regiones objetivo de interés. Los dos procedimientos de lavado y calor eliminan los productos que no se unieron específicamente a las perlas. La biblioteca enriquecida se eluye de las perlas y se prepara para la secuenciación.
- Limpieza de muestras de captura: por medio de perlas de purificación.
- Segunda amplificación PCR: este proceso amplifica la biblioteca capturada mediante un programa de PCR de 10 ciclos y se realiza la limpieza de PCR por medio de perlas de purificación para eliminar los productos no deseados.
- Validación de bibliotecas: se puede realizar por medio de cuantificación en el espectrofluorómetro o validación de la calidad según los tamaños de los fragmentos (200pb-1kb).
- Preparación de bibliotecas para la secuenciación en un MiSeq.

### 11.7 Electroforesis libererías:

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (TAE) para analizar la calidad de las libererías después de la primera PCR por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

### 11.8 Electroforesis libererías enriquecidas:

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (TAE) para analizar la calidad de las libererías después de la segunda PCR por medio del marcador de peso molecular y colorante para ácidos nucleicos (ADN).

### 11.9 Análisis de resultado:

Posterior a la corrida en el analizador genético de siguiente generación, se exportan los archivos de las secuencias genéticas en formato FASTA al software bioinformático para el análisis. El análisis inicial corresponde a la revisión de los parámetros de calidad de la corrida a responsabilidad del Biólogo; solo los casos que cumplan estos parámetros pasaran al siguiente análisis. El Médico Genetista analiza el caso por medio del software bioinformático para realizar el "llamado y clasificación de variantes" según bibliografía (3) y protocolos internos.

### 11.10 Elaboración y entrega de resultado:

El Biólogo y Médico Genetista encargados de la prueba, elaboran el resultado de la prueba en formato interno, el Médico Genetista a cargo evalúa el caso clínico y procede a presentarlo al grupo de trabajo (Biólogos y Médicos Genetistas) para la discusión de la clasificación de variantes, luego se realiza la validación múltiple con por lo menos por 3 Médicos Genetistas y posterior impresión de resultado.



**PNT.DNCC.INEN. 074 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL DE DETECCIÓN DE VARIANTES EN GENES ASOCIADOS A SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A CÁNCER POR SECUENCIAMIENTO DE SIGUIENTE GENERACIÓN - 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. Castellanos E, Gel B, Rosas I, Tornero E, Santín S, Pluvinet R, et al. A comprehensive custom panel design for routine hereditary cancer testing: preserving control, improving diagnostics and revealing a complex variation landscape. *Sci Rep.* 2017 Jan 4;7(1):1–12.
2. Surrey LF, MacFarland SP, Chang F, Cao K, Rathi KS, Akgumus GT, et al. Clinical utility of custom-designed NGS panel testing in pediatric tumors. *Genome Medicine.* 2019 May 28;11(1):32.
3. 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):4.

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC.INEN. 074 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE PANEL DE DETECCIÓN DE VARIANTES EN GENES ASOCIADOS A SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A CÁNCER POR SECUENCIAMIENTO DE SIGUIENTE GENERACIÓN - V.01**

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

**ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 – 8	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN).	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez





**PNT.DNCC.INEN. 075 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 2 Y  
3 DEL GEN KRAS (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 DETECCIÓN DE MUTACIONES POR  
SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 2 Y 3 DEL GEN KRAS (12, 13, 61)**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de mutaciones por secuenciamiento de los exones 2 y 3 del gen KRAS (12, 13, 61).

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81404.12
- Código Tarifario INEN: 210773

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección de mutaciones por secuenciamiento de los exones 2 y 3 del gen KRAS (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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar 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.
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: se encarga de la revisión de láminas para colocar 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: se encarga de la toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica).
- 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, y es responsable de su transmisión hereditaria.





**PNT.DNCC.INEN. 075 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 2 Y  
3 DEL GEN KRAS (12, 13, 61) - 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.
- Ácido Nucleico: Biomolécula portadora de la información genética. Biopolímero de elevado peso molecular, formado por otra subunidad o monómero, denominado Nucleótido.
- 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.
- 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 – 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.
- Línea somática: Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores y material genético propio de la célula neoplásica.
- 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 parafinado (tejido embebido en parafina): tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural
- Tejido fresco: Sección de tejido tomada por un proceso de biopsia, no parafinado.

### 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 TK en diferentes tipos de cáncer, especialmente en cáncer colorectal (1) (2).

### 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
- Microtomo de rotación
- Termociclador
- Analizador genético automatizado

**PNT.DNCC.INEN. 075 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 2 Y  
3 DEL GEN KRAS (12, 13, 61) - 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
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Computadora

**7.2 Instrumentales**

- Micropipeta volumen variable 0.5 uL – 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL – 200 uL
- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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

**III. SUMINISTROS****8.1 Insumos y material:**

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (Etanol) 98 % x 2.5 L
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla S
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Mandilón descartable talla estándar
- Aguja hipodérmica descartable N° 21 g x 1 1/2 In
- Cuchilla descartable de perfil alto para microtomo de rotación x 50
- Hoja de bisturí descartable N° 22
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 unidades
- Xilol Q.P. x 1 L





**PNT.DNCC.INEN. 075 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 2 Y  
3 DEL GEN KRAS (12, 13, 61) - V.01**

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

- Jeringa descartable de tuberculina 1 mL con aguja 26 G x 1/2 In
- Kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado x 50 reacciones
- Tips con filtro 1000 uL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 unidades
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- Primer KRAS-E3R 5'-TGCATGGCATTAGCAAAGAC-3' 50 n
- Primer KRAS-E3F 5'-TCAAGTCCTTTGCCCATTTT-3' 50 n
- Primer KRAS-E2R 5'-GAATGGTCCTGCACCAGTAA-3' 50 n
- Primer KRAS-E2F 5'-GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA-3' 50 n
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 unidades
- Deoxinucleótidos Dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 uL
- Solución tampón (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
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético abi 3500



## IX. SERVICIOS TÉCNICOS Y BÁSICOS

### 9.1 Servicios Técnicos:

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos





**PNT.DNCC.INEN. 075 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 2 Y  
3 DEL GEN KRAS (12, 13, 61) - V.01**

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

**9.2 Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

**X. MUESTRA**

**10.1. Obtención de la muestra:**

- Tejido embebido en parafina (TEEP): es realizado por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología
- Tejido fresco: es realizado por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN).

**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), protocolo descrito en el inserto 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 embebido en parafina (TEEP): muestra obtenida del área de conservación por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología
- Tejido fresco: muestra obtenida por procedimiento realizado por el Médico Cirujano Oncólogo los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

**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 Revisión de láminas:**

Realizado por el Médico Patólogo para definir regiones con más 10% de carga tumoral.

**11.4 Cortes de tejido:**

Luego de identificar la región a estudiar, se realiza por lo menos 5 cortes de 1-1.5 u del bloque de parafina, material que será colocado en un tubo de 1.5 mL para el siguiente paso.



**PNT.DNCC.INEN. 075 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 2 Y  
3 DEL GEN KRAS (12, 13, 61) - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.5 Desparafinización de la muestra:**

Los cortes en los tubos de 1.5 mL se someten a una batería de alcoholes (Xilol) para realizar la desparafinización.

**11.6 Aislamiento de ADN:**

Se realiza a partir del tejido desparafinado por medio del kit de extracción de ADN genómico y por método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante; los pellets obtenidos contienen el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer.

**11.7 Extracción y cuantificación de ADN:**

Se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro.

**11.8 Reacción en cadena de polimerasa:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio de uso de primers específicos para los exones 2 y 3 del gen KRAS por medio del 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 el producto amplificado de la región específica.

**11.9 Sistema de electroforesis horizontal:**

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.

**11.10 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 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:**

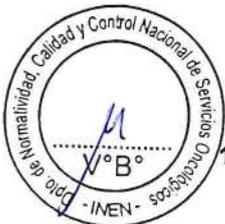
Los productos de la purificación son procesados con el Kit de secuenciamiento BigDye Terminator y primers específicos para los exones 2 y 3 del gen KRAS, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación por medio de ciclos de calor.

**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. 90-100uL).

**11.13 Secuenciamiento genético:**

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero Pop 7; luego se da inicio a la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para las regiones a analizar.



**PNT.DNCC.INEN. 075 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 2 Y  
3 DEL GEN KRAS (12, 13, 61) - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**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 (Alineamiento) y se comparan ambas secuencias en el software BioEdit para definir la presencia/ausencia de variantes a nivel de los exones 12 y 13 del gen KRAS, especialmente a nivel de los codones 12, 13 y 61 según bibliografía (4)(5) y protocolos internos.

**11.15 Elaboración y entrega de resultado:**

El Biólogo encargado de la prueba analiza las secuencias de los exones 12 y 13 para determinar la presencia de variantes por medio de "llamado de variantes" y elabora el resultado de la prueba, luego el médico genetista a cargo evalúa la "clasificación" de la variante encontrada y validará el resultado de la prueba.

**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. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 2004 Oct 21;431(7011):931–45
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):4
5. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J Mol Diagn. 2017;19(1):4–23

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC.INEN. 075 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DE LOS EXONES 2 Y 3 DEL GEN KRAS (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 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.	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC.INEN. 076 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA  
FAMILIAR EN EL GEN RET - 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 POR  
SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN RET****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección por secuenciamiento de variante patogénica familiar en el gen RET.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81404.13
- Código Tarifario INEN: 210784

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección por secuenciamiento de variante patogénica familiar en el gen RET, 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado, realizar la revisión del caso y de las variantes encontradas, así como validar los resultados impresos en físico.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar 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, y 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. 076 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA  
FAMILIAR EN EL GEN RET - 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 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
- Punción de Médula ósea: Prueba médica mínimamente invasiva que permite extraer una pequeña cantidad de médula ósea en forma líquida para su análisis.
- 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.
- Muestra de sangre periférica: Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica de laboratorio que consiste en la amplificación de un fragmento de ADN/cADN.
- 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.

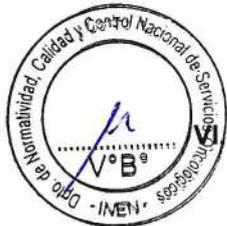
### SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Estudio de búsqueda de variante patogénica y/o probablemente patogénica familiar en familiares de pacientes con diagnóstico molecular de Neoplasia Endocrina Múltiple 2 o Espectro fenotípico asociado al gen RET (1) esta prueba sirve para identificar individuos portadores y definir estrategias de control de riesgos y reducción de riesgos en estos portadores.

## 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
- Termociclador



**PNT.DNCC.INEN. 076 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA  
FAMILIAR EN EL GEN RET - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Cámara fotográfica digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador

**7.2 Instrumentales**

- Micropipeta volumen variable 0.5 uL – 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL – 200 uL
- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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

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

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 500 mL
- Alcohol etílico (Etanol) 98% x 2.5 L
- Alcohol isopropílico (isopropanol) p.a. x 2.5 L
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 G x 1 In
- Tubo plástico 3 mL para extracción al vacío con EDTA
- Esparadrapo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m
- Jabón germicida líquido con triclosán x 800 mL
- Mascarilla descartable Tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Guardapolvo de dril manga larga para caballero talla S



**PNT.DNCC.INEN. 076 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA  
FAMILIAR EN EL GEN RET - 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
- 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
- Kit de extracción de ADN genómico x 100 determinaciones
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 0.5 mL x 1000
- Tips con filtro 1000 uL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 0.1 uL - 10 uL x 96
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- Primer RET EX11F: 5'-CAGAGCATACGCAGCCTGTAC-3' X 1000 Determinaciones
- Primer RET EX11R: 5'-GCCTCGTCTGCCAGCGTTG-3' X 1000 Determinaciones
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 unidades
- Deoxinucleótidos Dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 uL
- Solución tampón (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
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciamento bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamento x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético abi 3500





**PNT.DNCC.INEN. 076 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA  
FAMILIAR EN EL GEN RET - 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: es realizado por el Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.

### 10.2. Sistema biológico:

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN).

### 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 por bibliografía actual (2) (3), protocolo descrito en el inserto 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: es realizado por el personal técnico del Área de Trabajo Toma de Muestra del Equipo Funcional de Patología Clínica del Departamento de Patología.

### 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 nivel de bioseguridad II, limpieza de cámara de flujo laminar, y disposición de inicio de trabajo con la disposición de tubos de muestras de sangre periférica.

**PNT.DNCC.INEN. 076 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA  
FAMILIAR EN EL GEN RET - 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 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 pelle 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 a estudiar según antecedente familiar 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 con electroforesis:**

Se prepara el gel de agarosa al 3% con buffer Tris Acetato EDTA (TAE) que ayuda 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 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 a estudiar según antecedente familiar del gen RET, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación 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, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero Pop 7; luego se da inicio a la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para el gen a analizar.

**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



**PNT.DNCC.INEN. 076 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA  
FAMILIAR EN EL GEN RET - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

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 según bibliografía (4) y protocolos internos.

**11.12 Elaboración y entrega de resultado:**

El Biólogo encargado de la prueba analiza la secuencia del exón estudiado para determinar la presencia de la variante familiar y elabora el resultado de la prueba, con esa información, el Médico Genetista a cargo evalúa el caso clínico y procede a presentarlo al grupo de trabajo (Biólogos y Médicos Genetistas), luego se realiza la validación múltiple con por lo menos por 3 Médicos Genetistas y posterior impresión de resultado en formato interno.

**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. ANEXO**

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





**PNT.DNCC.INEN. 076 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN POR SECUENCIAMIENTO DE VARIANTE PATOGENICA FAMILIAR EN EL GEN RET - V.01**

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

**ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 – 8	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN.	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez





**PNT.DNCC.INEN. 077 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 15 DEL  
GEN BRAF (MUTACIÓN V 600) - 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 POR  
SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 15 DEL GEN BRAF (MUTACIÓN V 600)**

**I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Detección de mutaciones por secuenciamiento del exón 15 del gen BRAF (mutación V 600).

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 81404.11
- Código Tarifario INEN: 210774

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Detección de mutaciones por secuenciamiento del exón 15 del gen BRAF (mutación V 600), 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar 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.
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: se encarga de la revisión de láminas para colocar 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: se encarga de la toma de muestra de tejido fresco (biopsia/pieza quirúrgica).
- 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, y 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.

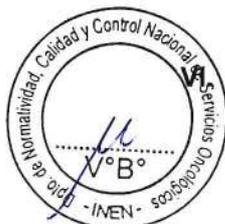




**PNT.DNCC.INEN. 077 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 15 DEL  
GEN BRAF (MUTACIÓN V 600) - V.01**

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.
- 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.
- 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 – 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.
- Línea somática: Línea celular que contiene material genético heredado de los progenitores y material genético propio de la célula neoplásica.
- 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.
- Tejido parafinado (tejido embebido en parafina): tejido sumergido y fijado en parafina para su conservación estructural
- 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.



### SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Estudio de la mutación V600 del gen BRAF para determinación de pronóstico (cáncer de tiroides, cáncer de colon) y uso de terapias target (melanoma, cáncer de colon) y otros, siendo su determinación clínicamente útil. (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
- Espectrofotómetro
- Microtomo de rotación
- Termociclador
- Analizador genético automatizado
- Congeladora de metal, color plomo
- Cámara fotográfica digital



**PNT.DNCC.INEN. 077 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 15 DEL  
GEN BRAF (MUTACIÓN V 600) - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Computadora

**7.2 Instrumentales**

- Micropipeta volumen variable 0.5 uL – 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL – 200 uL
- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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

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

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (Etanol) 98 % x 2.5 L
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla S
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Mandilón descartable talla estándar
- Aguja hipodérmica descartable N° 21 g x 1 1/2 In
- Cuchilla descartable de perfil alto para microtomo de rotación x 50
- Hoja de bisturí descartable N° 22
- Tubo de polipropileno para microcentrifuga de 1.5 mL x 500 unidades
- Xilol Q.P. x 1 L
- Jeringa descartable de tuberculina 1 mL con aguja 26 G x 1/2 In
- Kit para la extracción de ADN total de tejido formolado y/o parafinado x 50 reacciones



**PNT.DNCC.INEN. 077 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 15 DEL  
GEN BRAF (MUTACIÓN V 600) - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Tips con filtro 1000 uL x 96 unidades
- Tips estéril con filtro 20 uL - 200 uL x 96 unidades
- Calibrador para ADN de cadena doble para fluorómetro Qubit x 100 determinaciones
- Primer BRAF-E15R 5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3' 50 N
- Primer BRAF-E15F 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' 50 N
- Enzima taq ADN polimerasa termoactivable de alta fidelidad x 100 unidades
- Deoxinucleótidos Dntps 4 x 40 Umol en concentración 100 mm (kit)
- Marcador de peso molecular (100pb ladder) x 250 uL
- Solución tampón (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
- Kit para purificación de productos de PCR x 100 determinaciones
- Kit de secuenciamiento bigdye terminator v3.1 x 100 reacciones
- Kit para purificación de productos de reacción de secuenciamiento x 100 determinaciones
- Solución tampón (buffer) ánodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- Solución tampón (buffer) cátodo para analizador genético 3500 x 4 unidades
- 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 unidades
- Septa contenedor buffer cátodo para analizador genético 3500 x 10 unidades
- Arreglo de 8 capilares para analizador genético abi 3500

**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





**PNT.DNCC.INEN. 077 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 15 DEL  
GEN BRAF (MUTACIÓN V 600) - V.01**

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

**X. MUESTRA**

**10.1. Obtención de la muestra:**

- Tejido embebido en parafina (TEEP): es realizado por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología
- Tejido fresco: es realizado por los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN).

**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 (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 embebido en parafina (TEEP): muestra obtenida del área de conservación por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología
- Tejido fresco: muestra obtenida por procedimiento realizado por el Médico Cirujano Oncólogo los Departamentos de la Dirección de Cirugía.

**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 Revisión de láminas**

Realizado por el Médico Patólogo para definir regiones con más 10% de carga tumoral.

**11.4 Cortes de tejido:**

Luego de identificar la región a estudiar, se realiza por lo menos 5 cortes de 1-1.5 u del bloque de parafina, material que será colocado en un tubo de 1.5 mL para el siguiente paso.

**11.5 Desparafinización de la muestra:**

Los cortes en los tubos de 1.5 mL se someten a una batería de alcoholes (Xilol) para realizar la desparafinización.

**11.6 Aislamiento de ADN**

Se realiza a partir del tejido desparafinado por medio del kit de extracción de ADN genómico y por método de columnas: centrifugación y extracción de sobrenadante;





**PNT.DNCC.INEN. 077 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 15 DEL  
GEN BRAF (MUTACIÓN V 600) - V.01**

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

los pellets obtenidos contienen el ácido nucleico (ADN), el cual será resuspendido con Elution buffer.

**11.7 Extracción y cuantificación de ADN:**

Se realiza por medio del calibrador para ADN de doble cadena para fluorómetro y posterior medición en el espectrofotómetro.

**11.8 Reacción en cadena de polimerasa:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio de uso de primers específicos para el exón 15 del gen BRAF por medio del uso de enzima polimerasa para la amplificación (Enzima taq ADN polimerasa termiactivable de alta fidelidad) y deoxinucleótidos dNTPs. El proceso de amplificación se realiza por medio de ciclos de calor en el termociclador y se obtiene el producto amplificado de la región específica.



**11.9 Sistema de electroforesis horizontal:**

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.



**11.10 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 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 el exón 15 del gen BRAF, los productos obtenidos son llevados al termociclador para amplificación 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. 90-100 uL).



**11.13 Secuenciamiento genético:**

Los productos de la purificación son llevados en una microplaca de polipropileno de 96 pocillos al analizador genético, el cual debe estar cargado previamente con la septa de placa, la septa de contenedor de las soluciones tampón buffer: ánodo y cátodo; así como con los capilares que contienen el polímero Pop 7; luego se da inicio a la corrida de electroforesis capilar según el programa específico para las regiones a analizar.



**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 (Alineamiento) y se comparan ambas secuencias en el software BioEdit para definir la presencia/ausencia de



**PNT.DNCC.INEN. 077 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 15 DEL  
GEN BRAF (MUTACIÓN V 600) - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

variantes a nivel del exón 15 del gen BRAF, especialmente a nivel de los codones 12, 13 y 61 según bibliografía (4) y protocolos internos.

**11.15 Elaboración y entrega de resultado:**

El Biólogo encargado de la prueba analiza las secuencias de los exones 23 para determinar la presencia de variantes por medio de "llamado de variantes" y elabora el resultado de la prueba, luego el Médico Genetista a cargo evalúa la "clasificación" de la variante encontrada y valida el resultado de la prueba.

**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. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004 Oct 21;431(7011):931–45
3. 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):4
4. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19(1):4–23.

**XIII. ANEXO**

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



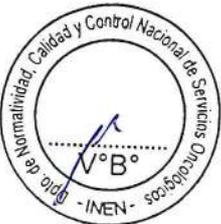
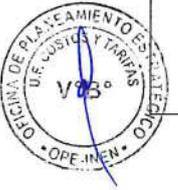


**PNT.DNCC.INEN. 077 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES POR SECUENCIAMIENTO DEL EXÓN 15 DEL GEN BRAF (MUTACIÓN V 600) - V.01**

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

**ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 – 8	Se elabora PNT según DA N° 001-2019-INEN/DICON-DNCC "Lineamientos para la elaboración de Documentos Normativos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (Resolución Jefatural N° 276-2019-J/INEN).	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC.INEN. 078 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL2 - 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 HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL2****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) BCL2.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88271.03
- Código Tarifario INEN: 210746

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) BCL2, en el área de Citogenética 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, desparafinización de la muestra, pre tratamiento de la muestra, denaturación e hibridación de la muestra, lavado de la muestra, análisis y emisión de resultado.
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: se encarga de la revisión de láminas para colocar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.
- 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 clorhídrico: Es una solución acuosa de hidrógeno. Su fórmula es HCl, es utilizado en diferentes procesos en laboratorio en forma diluida.
- Citogenética molecular: Pruebas o técnicas que se basan en la tecnología de la Hibridación In Situ con Florescencia.
- Cassettes de parafina: Soporte plástico para incluir tejido embebido en parafina.
- DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol): Marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas de Adenina y Timina en secuencias de ADN. Ampliamente usado en microscopía de fluorescencia.

**PNT.DNCC.INEN. 078 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL2 - V.01**

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

- Desnaturalización: La desnaturalización de ácidos nucleicos como el ADN a altas temperaturas produce la separación de la doble hélice, que ocurre porque los enlaces o puentes de hidrógeno se rompen.
- Florescencia. Sustancia fluorescente que se encuentra ligada a un segmento de ADN específico, que son capaces de emitir luz al ser excitadas por diferentes tipos de radiación.
- Hibridación: Es el proceso de unir dos hebras complementarias de ADN.
- Lámina Silanizada: Lámina de vidrio con cubierta especial, que incrementa la carga electrostática positiva, facilitando la adhesión de las secciones de los tejidos a la lámina.
- Muestra: Parte o cantidad pequeña de un tumor representativa del total, que se toma o separa de ella para ser utilizado en diferentes procedimientos.
- Tejido Tumoral: Fragmento tisular que corresponde al área neoplásica de la muestra
- XILOL (Xileno o dimetilbenceno): Es un derivado dimetilado del Benceno, según la posición relativa de los grupos metilo en el anillo bencénico. Se emplea como disolvente.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio del rearrreglo BCL2/18q21 para diagnóstico, pronóstico y seguimiento de linfomas según guías clínicas actuales (1).

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

- Equipo baño maria
- Estación de citogenética
- Sistema de hibridación y denaturación.
- Vortex, mezclador de tubos
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Microscopio binocular con lente de Inmersión
- Microtomo de rotación
- Cocina eléctrica
- Probeta de vidrio 100 mL
- Pinza de disección 10 cm
- Timer de 4 tiempos
- Coplín de vidrio vertical para 5 láminas

**7.2 Instrumentales**

- Micropipeta volumen variable 0.5 uL – 10 uL
- Micropipeta volumen variable 20 uL – 200 uL
- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 uL



**PNT.DNCC.INEN. 078 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL2 - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**7.3 Mobiliario**

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

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

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (Etanol) 99.8 % x 2.5 L
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla S
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Contenedor de polipropileno de bioseguridad de 4.8 L
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Kit para hibridación in situ fluorescente (FISH) para corte histológico x 20 determinaciones
- Sonda BCL2 conjugada con fluorocromo x 20 determinaciones
- Lápiz con punta de diamante para grabar en vidrio
- Lamina silanizada 25 mm x 75 mm x 100 unidades
- Agua destilada x 1 L
- Acido clorhídrico P.A. 37% x 1 L
- Alcohol etílico (Etanol) Absoluto 99.8% P.A. x 4 L
- Laminilla cobre objeto 22 mm x 22 mm x 100 unidades
- Tips 0.5 UI -10 UI x 500

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

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos



**PNT.DNCC.INEN. 078 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL2 - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**9.2 Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

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

- Tejido embebido en parafina (TEEP): es realizado por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN) en lámina sialinizada.

**10.3. Recipiente:**

- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Según criterios de conservación de Tejido embebido en parafina (TEEP).
- Lamina sialinizada: proceso inmediato, evitar ambientes contaminados y polvo.

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

Basado en metodología descrita en el inserto y protocolos propios del área de Citogenética del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

**11.1 Toma de muestra:**

Tejido embebido en parafina (TEEP): muestra obtenida del área de conservación por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**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 Revisión de láminas:**

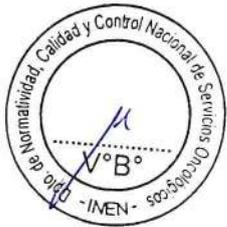
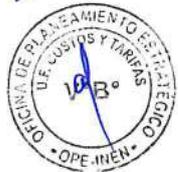
Realizado por el Médico Patólogo para definir regiones con más 10% de carga tumoral.

**11.4 Elección de la lámina y bloque:**

Realizado por el Médico Patólogo, define el área donde se realiza el proceso. Luego el bloque pasa a la realización de nuevos cortes y el armado de lámina silanizada.

**11.5 Desparafinización de muestra:**

Por medio de una batería de alcoholes (Xilol), se realizan los lavados de la lámina para eliminar la parafina.



**PNT.DNCC.INEN. 078 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL2 - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.6 Pre tratamiento de las muestras:**

En posterior se somete a la lámina a múltiples lavados con los reactivos del Kit Para Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) Para Corte Histológico este kit incluye la sonda break apart para el gen BCL2; así como pepsina para la digestión de proteínas y alcoholes para los diferentes lavados.

**11.7 Desnaturalización e hibridación de la muestra:**

Se somete a la lámina a altas temperaturas en el equipo Hibridador, para lograr la denaturación de la hebra de cadena doble de ADN; y luego se disminuye la temperatura para que ambas sondas hibridicen.

**11.8 Lavado de la muestra:**

Se realiza lavados múltiples con soluciones astringentes y alcoholes, para eliminar restos de sondas u trazas de parafina; la lámina final deberá ser conservada en el congelador.

**11.9 Análisis de resultado:**

La lámina preparada se carga en el microscopio de fluorescencia, se ubica la región a analizar y se realiza el conteo de 100 núcleos y en cada uno se determina la presencia de las señales fluorescentes, al ser una sonda break apart; la señal amarilla significa que no se produjo el rearreglo mientras que la presencia de señales roja y verde definen la presencia del rearreglo BCL2; se realiza el conteo de las señales en todas las células y se describe el número de células con el rearreglo según protocolos internos.

**11.10 Elaboración y entrega de resultado:**

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

**XIII. ANEXO**

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





**PNT.DNCC.INEN. 078 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL2 - V.01**  
 Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
 Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

**ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 – 6	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).	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC.INEN. 079 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL6 - 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 HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL6****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) BCL6.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88271.04
- Código Tarifario INEN: 210748

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) BCL6, en el área de Citogenética 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, desparafinización de la muestra, pre tratamiento de la muestra, denaturación e hibridación de la muestra, lavado de la muestra, análisis y emisión de resultado.
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: se encarga de la revisión de láminas para colocar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.
- 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 clorhídrico: Es una solución acuosa de hidrógeno. Su fórmula es HCl, es utilizado en diferentes procesos en laboratorio en forma diluida.
- Citogenética molecular: Pruebas o técnicas que se basan en la tecnología de la Hibridación In Situ con Florescencia.
- Cassettes de parafina: Soporte plástico para incluir tejido embebido en parafina.
- DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol): Marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas de Adenina y Timina en secuencias de ADN. Ampliamente usado en microscopía de fluorescencia.

**PNT.DNCC.INEN. 079 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL6 - V.01**

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

- Desnaturalización: La desnaturalización de ácidos nucleicos como el ADN a altas temperaturas produce la separación de la doble hélice, que ocurre porque los enlaces o puentes de hidrógeno se rompen.
- Florescencia. Sustancia fluorescente que se encuentra ligada a un segmento de ADN específico, que son capaces de emitir luz al ser excitadas por diferentes tipos de radiación.
- Hibridación: Es el proceso de unir dos hebras complementarias de ADN.
- Lámina Silanizada: Lámina de vidrio con cubierta especial, que incrementa la carga electrostática positiva, facilitando la adhesión de las secciones de los tejidos a la lámina.
- Muestra: Parte o cantidad pequeña de un tumor representativa del total, que se toma o separa de ella para ser utilizado en diferentes procedimientos.
- Tejido Tumoral: Fragmento tisular que corresponde al área neoplásica de la muestra
- XILOL (Xileno o dimetilbenceno): Es un derivado dimetilado del Benceno, según la posición relativa de los grupos metilo en el anillo bencénico. Se emplea como disolvente.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

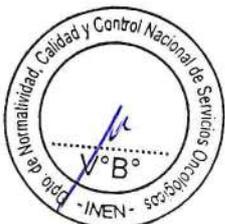
Estudio del rearrreglo BCL6/3q27 para diagnóstico, pronóstico y seguimiento de linfomas según guías clínicas actuales (1).

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

- Equipo baño maria
- Estación de citogenética
- Sistema de hibridización y denaturación.
- Vortex, mezclador de tubos
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Microscopio binocular con lente de Inmersión
- Microtomo de rotación
- Cocina eléctrica
- Probeta de vidrio 100 mL
- Pinza de disección 10 cm
- Timer de 4 tiempos
- Coplín de vidrio vertical para 5 láminas
- Computadora
- Impresora láser

**7.2 Instrumentales**

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



**PNT.DNCC.INEN. 079 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL6 - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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

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

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (Etanol) 99.8 % x 2.5 L
- Xilol Q.P. x 4 L
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla S
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Contenedor de polipropileno de bioseguridad de 4.8 L
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Kit para hibridación in situ fluorescente (FISH) para corte histológico x 20 determinaciones
- Sonda BCL2 conjugada con fluorocromo x 20 determinaciones
- Lápiz con punta de diamante para grabar en vidrio
- Lámina silanizada 25 mm x 75 mm x 100 unidades
- Agua destilada x 1 L
- Acido clorhídrico P.A. 37% x 1 L
- Alcohol etílico (Etanol) Absoluto 99.8% P.A. x 4 L
- Laminilla cubre objeto 22 mm x 22 mm x 100 unidades
- Tips 0.5 UI -10 UI x 500

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

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos biomédicos



**PNT.DNCC.INEN. 079 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL6 - 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:**

- Tejido embebido en parafina (TEEP): es realizado por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN) en lámina sializada.

**10.3. Recipiente:**

- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Según criterios de conservación de Tejido embebido en parafina (TEEP).
- Lamina sializada: proceso inmediato, evitar ambientes contaminados y polvo.

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

Basado en metodología descrita en el inserto y protocolos propios del área de Citogenética del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

**11.1 Toma de muestra:**

Tejido embebido en parafina (TEEP): muestra obtenida del área de conservación por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**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 Elección de la lámina y bloque:**

Realizado por el Médico Patólogo, define el área donde se realiza el proceso. Luego el bloque pasa a la realización de nuevos cortes y el armado de lámina silanizada.

**11.4 Desparafinización de muestra:**

Por medio de una batería de alcoholes (Xilol), se realizan los lavados de la lámina para eliminar la parafina.

**11.5 Pre tratamiento de las muestras:**

**PNT.DNCC.INEN. 079 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL6 - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

En posterior se somete a la lámina a múltiples lavados con los reactivos del Kit Para Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) para corte histológico este kit incluye la sonda break apart para el gen BCL6; así como pepsina para la digestión de proteínas y alcoholes para los diferentes lavados.

**11.6 Desnaturalización e hibridación de la muestra:**

Se somete a la lámina a altas temperaturas en el equipo Hibridador, para lograr la denaturación de la hebra de cadena doble de ADN; y luego se disminuye la temperatura para que ambas sondas hibridicen.

**11.7 Lavado de la muestra:**

Se realiza lavados múltiples con soluciones astringentes y alcoholes, para eliminar restos de sondas u trazas de parafina; la lámina final deberá ser conservada en el congelador.

**11.8 Análisis de resultado:**

La lámina preparada se carga en el microscopio de fluorescencia, se ubica la región a analizar y se realiza el conteo de 100 núcleos y en cada uno se determina la presencia de las señales fluorescentes, al ser una sonda break apart; la señal amarilla significa que no se produjo el rearreglo mientras que la presencia de señales roja y verde definen la presencia del rearreglo BCL6; se realiza el conteo de las señales en todas las células y se describe el número de células con el rearreglo según protocolos internos.

**11.9 Elaboración y entrega de resultado:**

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

**XIII. ANEXO**

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



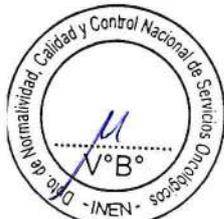


### PNT.DNCC.INEN. 079 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) BCL6 - V.01

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

#### ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 - 6	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).	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC.INEN. 080 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) HER2/NEU - 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 HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA HER2/NEU****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Hibridación in situ con fluorescencia HER2/NEU.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88271.01
- Código Tarifario INEN: 210710

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Hibridación in situ con fluorescencia HER2/NEU, en el área de Citogenética 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, desparafinización de la muestra, pre tratamiento de la muestra, denaturación e hibridación de la muestra, lavado de la muestra, análisis y emisión de resultado.
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: se encarga de la revisión de láminas para colocar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.
- 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 clorhídrico: Es una solución acuosa de hidrógeno. Su fórmula es HCl, es utilizado en diferentes procesos en laboratorio en forma diluida.
- Citogenética molecular: Pruebas o técnicas que se basan en la tecnología de la Hibridación In Situ con Florescencia.
- Cassettes de parafina: Soporte plástico para incluir tejido embebido en parafina.
- DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol): Marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas de Adenina y Timina en secuencias de ADN. Ampliamente usado en microscopía de fluorescencia.

**PNT.DNCC.INEN. 080 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) HER2/NEU - V.01**

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

- Desnaturalización: La desnaturalización de ácidos nucleicos como el ADN a altas temperaturas produce la separación de la doble hélice, que ocurre porque los enlaces o puentes de hidrógeno se rompen.
- Florescencia. Sustancia fluorescente que se encuentra ligada a un segmento de ADN específico, que son capaces de emitir luz al ser excitadas por diferentes tipos de radiación.
- Hibridación: Es el proceso de unir dos hebras complementarias de ADN.
- Lámina Silanizada: Lámina de vidrio con cubierta especial, que incrementa la carga electrostática positiva, facilitando la adhesión de las secciones de los tejidos a la lámina.
- Muestra: Parte o cantidad pequeña de un tumor representativa del total, que se toma o separa de ella para ser utilizado en diferentes procedimientos.
- Tejido Tumoral: Fragmento tisular que corresponde al área neoplásica de la muestra
- XILOL (Xileno o dimetilbenceno): Es un derivado dimetilado del Benceno, según la posición relativa de los grupos metilo en el anillo bencénico. Se emplea como disolvente.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de la amplificación del gen HER2 en cáncer de mama, en casos de resultado dudoso del estudio por inmunohistoquímica para definir tratamiento target (1).

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

- Equipo baño maria
- Estación de citogenética
- Sistema de hibridización y denaturación.
- Vortex, mezclador de tubos
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Microscopio binocular con lente de Inmersión
- Microtomo de rotación
- Cocina eléctrica
- Probeta de vidrio 100 mL
- Pinza de disección 10 cm
- Timer de 4 tiempos
- Coplín de vidrio vertical para 5 láminas
- Computadora
- Impresora láser

**7.2 Instrumentales**

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



**PNT.DNCC.INEN. 080 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) HER2/NEU - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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

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

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (Etanol) 99.8 % x 2.5 L
- Xilol Q.P. x 4 L
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante de nitrilo Talla S
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Kit Sonda para amplificación gen HER2/Neu Pharmdxtm x 20 Test
- Lápiz con punta de diamante para grabar en vidrio
- Lámina silanizada 25 mm x 75 mm x 100 unidades
- Agua destilada x 1 L
- Acido clorhídrico P.A. 37% x 1 L
- Laminilla cubre objeto 22 mm x 22 mm x 100 unidades
- Tips 0.5 UI -10 UI x 500

**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



**PNT.DNCC.INEN. 080 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) HER2/NEU - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Teléfono

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

- Tejido embebido en parafina (TEEP): es realizado por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN) en lámina sialinizada.

**10.3. Recipiente:**

- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Según criterios de conservación de Tejido embebido en parafina (TEEP).
- Lamina sialinizada: proceso inmediato, evitar ambientes contaminados y polvo.

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

Basado en metodología descrita en el inserto y protocolos propios del área de Citogenética del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

**11.1 Toma de muestra:**

Tejido embebido en parafina (TEEP): muestra obtenida del área de conservación por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**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 Elección de la lámina y bloque:**

Realizado por el Médico Patólogo, define el área donde se realiza el proceso. Luego el bloque pasa a la realización de nuevos cortes y el armado de lámina silanizada.

**11.4 Desparafinización de muestra:**

Por medio de una batería de alcoholes (Xilol), se realizan los lavados de la lámina para eliminar la parafina.

**11.5 Pre tratamiento de las muestras:**En posterior se somete a la lámina a múltiples lavados con los reactivos del kit sonda para amplificación gen HER2/NEU, este kit incluye la sonda de hibridación para el gen HER<sup>2</sup> y la para la región centromérica del cromosoma 17 (CEP17); así como pepsina para la digestión de proteínas y alcoholes para los diferentes lavados.**11.6 Desnaturalización e hibridación de la muestra:**

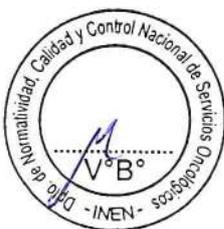


**PNT.DNCC.INEN. 080 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) HER2/NEU - V.01**

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

**ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 - 6	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).	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC.INEN. 080 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) HER2/NEU - V.01**

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

Se somete a la lámina a altas temperaturas en el equipo Hibridador, para lograr la denaturación de la hebra de cadena doble de ADN; y luego se disminuye la temperatura para que ambas sondas hibridicen.

**11.7 Lavado de la muestra:**

Se realiza lavados múltiples con soluciones astringentes y alcoholes, para eliminar restos de sondas u trazas de parafina; la lámina final deberá ser conservada en el congelador.

**11.8 Análisis de resultado:**

La lámina preparada se carga en el microscopio de fluorescencia, se ubica la región a analizar y se realiza el conteo de 20 núcleos, y en cada uno se determina la presencia de las señales fluorescentes del gen HER2/NEU (rojo) y del CEP17 (verde); se realiza el conteo en todas las células y se obtiene una razón entre el número de señales rojas sobre el número de señales verdes; las razones se categorizan en 5 grupos: Grupo 1: razón HER2/CEP17 $\geq$ 2, copias HER2 $\geq$ 4 señales/célula; Grupo 2: razón HER2/CEP17 $\geq$ 2, copias HER2 $<$ 4 señales/célula; Grupo 3: razón HER2/CEP17 $<$ 2, copias HER2 $\geq$ 6 señales/célula; Grupo 4: razón HER2/CEP17 $<$ 2, copias HER2  $\geq$ 4 y  $<$ 6 señales/célula y Grupo 5: razón HER2/CEP17 $<$ 2, copias HER2 $<$ 4 señales/célula; siendo los Grupos 1 y 5 resultados definitivos (Amplificado y no amplificado); mientras que los Grupos 2, 3 y 4 ameritan reevaluación con otra metodología; según bibliografía (1) y protocolos internos.

**11.9 Elaboración y entrega de resultado:**

Al obtener resultados en los grupos 1 y 5, el Biólogo encargado de la prueba, elabora el resultado en la plataforma informática SISINEN, dicho resultado será validado según evaluación de datos clínicos y de otros exámenes auxiliares por el Médico Genetista permitiendo visualizar dichos resultados en el sistema SISINEN. En el caso de los grupos 2, 3, y 4 el resultado será evaluado en posterior a la reevaluación con otra metodología y discusión de caso con el equipo de trabajo.

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. J Clin Oncol. 2018 10;36(20):2105–22.

**XIII. ANEXO**

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



**PNT.DNCC.INEN. 081 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) MYC- 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 HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) MYC****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) MYC.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88271.05
- Código Tarifario INEN: 210747

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) MYC, en el área de Citogenética 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, desparafinización de la muestra, pre tratamiento de la muestra, desnaturación e hibridación de la muestra, lavado de la muestra, análisis y emisión de resultado.
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: se encarga de la revisión de láminas para colocar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.
- 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 clorhídrico: Es una solución acuosa de hidrógeno. Su fórmula es HCl, es utilizado en diferentes procesos en laboratorio en forma diluida.
- Citogenética molecular: Pruebas o técnicas que se basan en la tecnología de la Hibridación In Situ con Florescencia.
- Cassettes de parafina: Soporte plástico para incluir tejido embebido en parafina.
- DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol): Marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas de Adenina y Timina en secuencias de ADN. Ampliamente usado en microscopía de fluorescencia.

**PNT.DNCC.INEN. 081 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) MYC- V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Desnaturalización: La desnaturalización de ácidos nucleicos como el ADN a altas temperaturas produce la separación de la doble hélice, que ocurre porque los enlaces o puentes de hidrógeno se rompen.
- Florescencia. Sustancia fluorescente que se encuentra ligada a un segmento de ADN específico, que son capaces de emitir luz al ser excitadas por diferentes tipos de radiación.
- Hibridación: Es el proceso de unir dos hebras complementarias de ADN.
- Lámina Silanizada: Lámina de vidrio con cubierta especial, que incrementa la carga electrostática positiva, facilitando la adhesión de las secciones de los tejidos a la lámina.
- Muestra: Parte o cantidad pequeña de un tumor representativa del total, que se toma o separa de ella para ser utilizado en diferentes procedimientos.
- Tejido Tumoral: Fragmento tisular que corresponde al área neoplásica de la muestra
- XILOL (Xileno o dimetilbenceno): Es un derivado dimetilado del Benceno, según la posición relativa de los grupos metilo en el anillo bencénico. Se emplea como disolvente.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio del rearrreglo MYC/8q24 para diagnóstico, pronóstico y seguimiento de linfomas según guías clínicas actuales (1).

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

- Equipo baño maria
- Estación de citogenética
- Sistema de hibridización y denaturación.
- Vortex, mezclador de tubos
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Microscopio binocular con lente de Inmersión
- Microtomo de rotación
- Cocina eléctrica
- Probeta de vidrio 100 mL
- Pinza de disección 10 cm
- Timer de 4 tiempos
- Coplín de vidrio vertical para 5 láminas
- Computadora
- Impresora láser

**7.2 Instrumentales**

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



**PNT.DNCC.INEN. 081 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) MYC- V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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

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

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (Etanol) 99.8 % x 2.5 L
- Xilol Q.P. x 4 L
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante de nitrilo Talla S
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Tacho de plástico 25 L Aprox.
- Contenedor de polipropileno de bioseguridad de 4.8 L
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Sonda MYC Conjugada Con Fluorocromo X 20 Determinaciones
- Kit Para Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) Para Corte Histológico X 20 Determinaciones
- Lápiz con punta de diamante para grabar en vidrio
- Lámina silanizada 25 mm x 75 mm x 100 unidades
- Agua destilada x 1 L
- Acido clorhídrico P.A. 37% x 1 L
- Laminilla cubre objeto 22 mm x 22 mm x 100 unidades
- Tips 0.5 UI -10 UI x 500

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

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado

**PNT.DNCC.INEN. 081 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) MYC- 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:**

- Tejido embebido en parafina (TEEP): es realizado por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN) en lámina sialinizada.

**10.3. Recipiente:**

- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Según criterios de conservación de Tejido embebido en parafina (TEEP).
- Lamina sialinizada: proceso inmediato, evitar ambientes contaminados y polvo.

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

Basado en metodología descrita en el inserto y protocolos propios del área de Citogenética del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

**11.1 Toma de muestra:**

Tejido embebido en parafina (TEEP): muestra obtenida del área de conservación por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**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 Elección de la lámina y bloque:**

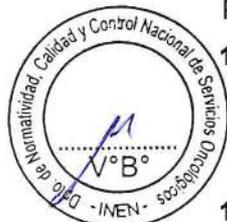
Realizado por el Médico Patólogo, define el área donde se realiza el proceso. Luego el bloque pasa a la realización de nuevos cortes y el armado de lámina silanizada.

**11.4 Desparafinización de muestra:**

Por medio de una batería de alcoholes (Xilol), se realizan los lavados de la lámina para eliminar la parafina.

**11.5 Pre tratamiento de las muestras:**

En posterior se somete a la lámina a múltiples lavados con los reactivos del Kit Para Hibridación In Situ Fluorescente (Fish) para corte histológico este kit incluye la



**PNT.DNCC.INEN. 081 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) MYC- V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

sonda break apart para el gen MYC; así como pepsina para la digestión de proteínas y alcoholes para los diferentes lavados.

**11.6 Desnaturalización e hibridación de la muestra:**

Se somete a la lámina a altas temperaturas en el equipo Hibridador, para lograr la desnaturalización de la hebra de cadena doble de ADN; y luego se disminuye la temperatura para que ambas sondas hibridicen.

**11.7 Lavado de la muestra:**

Se realiza lavados múltiples con soluciones astringentes y alcoholes, para eliminar restos de sondas u trazas de parafina; la lámina final deberá ser conservada en el congelador.

**11.8 Análisis de resultado:**

La lámina preparada se carga en el microscopio de fluorescencia, se ubica la región a analizar y se realiza el conteo de 100 núcleos y en cada uno se determina la presencia de las señales fluorescentes, al ser una sonda break apart; la señal amarilla significa que no se produjo el rearreglo mientras que la presencia de señales roja y verde definen la presencia del rearreglo MYC; se realiza el conteo de las señales en todas las células y se describe el número de células con el rearreglo según protocolos internos.

**11.9 Elaboración y entrega de resultado:**

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

**XIII. ANEXO**

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



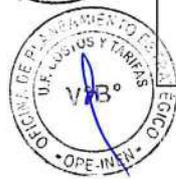


### PNT.DNCC.INEN. 081 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) MYC- V.01

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

#### ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 - 6	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.	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez



**PNT.DNCC.INEN. 082 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) ALK - 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 HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) ALK****I. OBJETIVO**

Normalizar el procedimiento de Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) ALK.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS**

- Código CPMS (MINSA): 88271.02
- Código Tarifario INEN: 210745

**III. ALCANCE**

El presente documento normativo se emplea para el procedimiento de Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) ALK, en el área de en el área de Citogenética 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: se encarga de supervisar el proceso, apoyar en el análisis del resultado y validar los resultados en la plataforma informática SISINEN.
- Biólogo del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular: se encarga de realizar los procesos de la muestra, desde la codificación interna de la muestra, desparafinización de la muestra, pre tratamiento de la muestra, desnaturación e hibridación de la muestra, lavado de la muestra, análisis y emisión de resultado.
- Médico Patólogo del Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia: se encarga de la revisión de láminas para colocar la marcación de la zona de estudio, así como elegir el bloque de tejido embebido en parafina específicos para estudio.
- 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 clorhídrico: Es una solución acuosa de hidrógeno. Su fórmula es HCl, es utilizado en diferentes procesos en laboratorio en forma diluida.
- Citogenética molecular: Pruebas o técnicas que se basan en la tecnología de la Hibridación In Situ con Florescencia.
- Cassettes de parafina: Soporte plástico para incluir tejido embebido en parafina.
- DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol): Marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas de Adenina y Timina en secuencias de ADN. Ampliamente usado en microscopía de fluorescencia.

**PNT.DNCC.INEN. 082 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) ALK - V.01**

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

- Desnaturalización: La desnaturalización de ácidos nucleicos como el ADN a altas temperaturas produce la separación de la doble hélice, que ocurre porque los enlaces o puentes de hidrógeno se rompen.
- Florescencia. Sustancia fluorescente que se encuentra ligada a un segmento de ADN específico, que son capaces de emitir luz al ser excitadas por diferentes tipos de radiación.
- Hibridación: Es el proceso de unir dos hebras complementarias de ADN.
- Lámina Silanizada: Lámina de vidrio con cubierta especial, que incrementa la carga electrostática positiva, facilitando la adhesión de las secciones de los tejidos a la lámina.
- Muestra: Parte o cantidad pequeña de un tumor representativa del total, que se toma o separa de ella para ser utilizado en diferentes procedimientos.
- Tejido Tumoral: Fragmento tisular que corresponde al área neoplásica de la muestra
- XILOL (Xileno o dimetilbenceno): Es un derivado dimetilado del Benceno, según la posición relativa de los grupos metilo en el anillo bencénico. Se emplea como disolvente.

**VI. SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

Estudio de la rearreglo ALK/2p23 para la selección de terapia en los pacientes con Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) avanzado y que media el uso de terapia target o blanco (1).

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

- 
- 
- 
- Equipo baño maria
  - Estación de citogenética
  - Sistema de hibridación y denaturación.
  - Vortex, mezclador de tubos
  - Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
  - Microscopio binocular con lente de Inmersión
  - Microtomo de rotación
  - Cocina eléctrica
  - Probeta de vidrio 100 mL
  - Pinza de disección 10 cm
  - Timer de 4 tiempos
  - Coplín de vidrio vertical para 5 láminas
  - Computadora
  - Impresora láser

**7.2 Instrumentales**

- Micropipeta volumen variable 0.5 uL – 10 uL

**PNT.DNCC.INEN. 082 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) ALK - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Micropipeta volumen variable 20 uL – 200 uL
- Micropipeta volumen variable 2 uL – 20 uL
- Micropipeta volumen variable 100 uL – 20 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

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

- Alcohol etílico (Etanol) 70° x 1 L
- Alcohol etílico (Etanol) 99.8 % x 2.5 L
- Xilol Q.P. x 4 L
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante de nitrilo Talla S
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 mL
- Tacho de plástico 25 L Aprox.
- Contenedor de polipropileno de bioseguridad de 4.8 L
- Bolsa de polietileno 72 cm x 51 cm color rojo
- Kit Sonda para rearreglo gen Alk Pathvysion 20 Determinaciones x 4 Piezas
- Lápiz con punta de diamante para grabar en vidrio
- Lámina silanizada 25 mm x 75 mm x 100 unidades
- Agua destilada x 1 L
- Laminilla cubre objeto 22 mm x 22 mm x 100 unidades
- Tips 0.5 UI -10 UI x 500

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

Mantenimiento preventivo de Equipamiento:

- Equipos biomédicos
- Equipos de aire acondicionado
- Equipos eléctricos



**PNT.DNCC.INEN. 082 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) ALK - V.01**

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

**9.2 Servicios Públicos:**

- Agua
- Luz
- Teléfono

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

- Tejido embebido en parafina (TEEP): es realizado por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**10.2. Sistema biológico:**

- Ácidos nucleicos: Ácido desoxirribonucleico (ADN) en lámina sialinizada.

**10.3. Recipiente:**

- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de parafina.

**10.4. Conservación y manejo:**

- Según criterios de conservación de Tejido embebido en parafina (TEEP).
- Lamina sialinizada: proceso inmediato, evitar ambientes contaminados y polvo.

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

Basado en metodología descrita en el inserto y protocolos propios del área de Citogenética del Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular del Departamento de Patología:

**11.1 Toma de muestra:**

Tejido embebido en parafina (TEEP): muestra obtenida del área de conservación por el Equipo Funcional de Patología Quirúrgica y Necropsia del Departamento de Patología.

**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 Elección de la lámina y bloque:**

Realizado por el Médico Patólogo, define el área donde se realiza el proceso. Luego el bloque pasa a la realización de nuevos cortes y el armado de lámina silanizada.

**11.4 Desparafinización de muestra:**

Por medio de una batería de alcoholes (Xilol), se realizan los lavados de la lámina para eliminar la parafina.

**11.5 Pre tratamiento de las muestras:**

En posterior se somete a la lámina a múltiples lavados con los reactivos del Kit Sonda Para Rearreglo Gen Alk Pathvysion, este kit incluye la sonda break apart para el gen ALK, controles positivos y negativos; así como pepsina para la digestión de proteínas y alcoholes para los diferentes lavados.



**PNT.DNCC.INEN. 082 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) ALK - V.01**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular**11.6 Desnaturalización e hibridación de la muestra:**

Se somete a la lámina a altas temperaturas en el equipo Hibridador, para lograr la desnaturalización de la hebra de cadena doble de ADN; y luego se disminuye la temperatura para que ambas sondas hibridicen.

**11.7 Lavado de la muestra:**

Se realiza lavados múltiples con soluciones astringentes y alcoholes, para eliminar restos de sondas u trazas de parafina; la lámina final deberá ser conservada en el congelador.

**11.8 Análisis de resultado:**

La lámina preparada se carga en el microscopio de fluorescencia, se ubica la región a analizar y se realiza el conteo de 50 núcleos y en cada uno se determina la presencia de las señales fluorescentes, al ser una sonda break apart; la señal amarilla significa que no se produjo el rearreglo mientras que la presencia de señales roja y verde definen la presencia del rearreglo ALK; se realiza el conteo de las señales en todas las células y se categoriza el resultado en: Negativo para el rearreglo: <5 células (5/50) son positivas para el rearreglo; Positivo para el rearreglo: >25 células (25/50) son positivas para el rearreglo. Equívoco: 5-25 células son positivas para el rearreglo; en este grupo es necesario realizar un segundo conteo de 100 células; si se encuentran >15/100 se considera negativo; si se encuentran  $\geq 15/100$  la muestra se considerará positiva según bibliografía (1) y protocolos internos.

**11.9 Elaboración y entrega de resultado:**

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

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. Arch Pathol Lab Med. 2018 Mar;142(3):321-46.

**XIII. ANEXO**

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





### PNT.DNCC.INEN. 082 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH) ALK - V.01

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

#### ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS				
VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)	AUTORIZA ELABORACIÓN (ACTUALIZACIÓN)
01	1 - 6	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.	10/08/2020	M.C. Pamela Mora Alferez





**PNT.DNCC.INEN. 083 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE INESTABILIDAD DE MICROSATELITES V0.1**

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 INESTABILIDAD DE MICROSATELITES**

**I. OBJETIVO. –**

Normalizar el Procedimiento de Detección de Inestabilidad de Microsatélites.

**II. IDENTIFICACIÓN DEL CPMS. –**

- Código CPMS (MINSa) 88299.11
- Código tarifario INEN 210741

**III. ALCANCE. –**

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

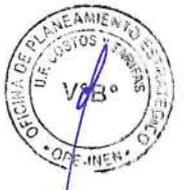
**IV. RESPONSABILIDADES. –**

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 ADN, amplificación, electroforesis por bioanalizador, 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.
- 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: revisión de laminas 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.





**PNT.DNCC.INEN. 083 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE INESTABILIDAD DE MICROSATELITES V0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Muestra de sangre periférica.- Parte de sangre que se considera representativa del total y que se consigue con ciertos métodos para someterla a estudio.
- 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 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.
- 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.

**SIGNIFICANCIA CLÍNICA. –**

Este estudio está indicado para la determinación de la inestabilidad de microsátélites por medio de marcadores definidos según panel de Bethesda (BAT25, BAT26, D2S125, D5S346 y D17S250) en casos de sospecha de falla de sistema de reparación de apareamiento de bases (Mismatch repair, MMR) mediante la comparación de los perfiles alélicos de tejido control (sangre periférica) y tejido tumoral. Se utiliza para descartar de síndromes de predisposición genética a cáncer de colon y también para estimar la respuesta al tratamiento adyuvante con 5-fluorouracilo y/o estimar pronóstico (1).

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

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



**PNT.DNCC.INEN. 083 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE INESTABILIDAD DE MICROSATELITES V0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- Cámara Fotográfica Digital
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder para electroforesis de geles de agarosa
- Balanza pequeña digital
- Transiluminador
- Refrigeradora de 02 puertas, color blanco
- Congeladora de metal
- Equipo de aire acondicionado (2)
- Impresora Láser Blanco y negro 52 ppm
- Lectora de Código de barras
- Impresora de Código de barras térmica 102 mm/seg

**7.2 Instrumentales. –**

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

**7.3 Mobiliario. –**

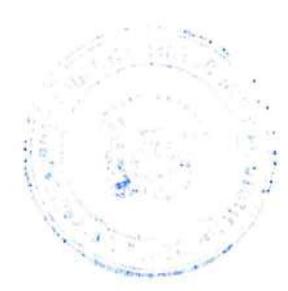
- Silla giratoria de metal tipo cajero
- Estante de melanina
- Módulo de melanina para computadora
- Mesa de metal
- Silla fija de metal con brazos
- Coche metálico para transporte en general con plataforma de metal

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

- Mascarilla descartable tipo N-95
- Guante para examen descartable talla S
- Alcohol etílico (etanol) 70° x 500 ml
- Algodón hidrófilo x 500 g
- Aguja múltiple para extracción de sangre al vacío 22 g x 1 in
- Tubo plástico 3 ml para extracción al vacío con edta
- Esparadrupo antialérgico de papel 2.5 cm x 9.1 m
- Gel antibacterial para manos x 1 L aprox.
- Papel toalla x 300 m



Faint, illegible text or markings in the middle right section of the page.



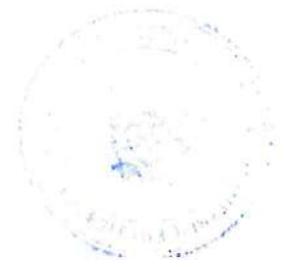
**PNT.DNCC.INEN. 083 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE INESTABILIDAD DE MICROSATELITES V0.1**Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

- 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
- Papel bond 75 g tamaño A4 (2)
- Tóner de impresión para Xerox cód. Ref. 106r02318 negro (2)
- Bolígrafo (lapicero) de tinta seca punta fina color azul
- Papel toalla de hojas separadas x 200 hojas
- Jabón germicida líquido x 800 ml
- Mascarilla descartable quirúrgica 3 pliegues
- Guante para examen descartable talla m
- Tacho de plástico 25 L aprox.
- Xilol Q.P. X 1 L
- Alcohol Etilico (Etanol) 98.0% X 2.5 L
- Tips Con Filtro 1000 uL X 96
- Tips Con Filtro 200 uL X 96
- Kit De Extraccion De ADN Genomico X 50 Determinaciones
- Kit Para La Extraccion De Arn Total De Tejido Formolado Y/O Parafinado X 50 Reacciones
- Plumon Resaltador Punta Mediana Biselada
- Primer Bat40-F 5'-ATTAACCTTCCTACACCACAAC-3' 50 N
- Primer Bat40-R 5'-GTAGAGCAAGACCACCTTG-3' 50 N
- Primer Bat25-F 5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3' 50 N
- Primer Bat25-R 5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3' 50 N
- Primer Bat26-F 5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3' 50 N
- Primer Bat26-R 5'-AACCATTCAACATTTTAAACCC-3' 50 N
- Primer D2S123-F 5'-GCCAGAGAAATTAGACACAGTG-3' 50 N
- Primer D2S123-R 5'-CTGACTTGGATACCATCTATCTA-3' 50 N
- Primer D5S346-F 5'-TACTCACTCTAGTGATAAATCGG-3' 50 N
- Primer D5S346-R 5'-TTCAGGGAATTGAGAGTTACAG-3' 50 N





4



**PNT.DNCC.INEN. 083 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE INESTABILIDAD DE MICROSATELITES V0.1**

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

- Primer D17S250-F 5'-AATAGACAATAAAAATATGTGTGTG-3' 50 N
- Primer D17S250-R 5'-TATATATTTAAACCATTTGAAAGTG-3' 50 N
- Enzima Taq Adn Polimerasa Termoactivable De Alta Fidelidad X 100 U
- Deoxinucleotidos Dntps 4 X 40 Umol En Concentracion 100 Mm (Kit)
- Tips Esteril Con Filtro 0.5 Ul - 10 Ul (Maxima Recuperacion) X 96 Uni/Rack
- Set De Reactivos De Analisis De Arn Para Equipo Bioanalizador X 25 Determinaciones

**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.
- 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 Desoxirribonucleico (ADN).

**10.3. Recipiente:**

- Sangre Venosa: tubo al vacío con anticoagulante EDTA de potasio.
- Tejido embebido en parafina (TEEP): bloque de 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
- Los necesarios al bloque de parafina.





**PNT.DNCC.INEN. 083 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE INESTABILIDAD DE MICROSATELITES V0.1**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 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.

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 Extracción de ADN:**

Previo a este paso se realiza la revisión de láminas por el medico patologo del E. F. de Patología Quirurgica, debe definir regiones con mas 10% de carga tumoral. Luego de identificar la región a estudiar, se realizará por lo menos 5 cortes de 1-1.5u del bloque de parafina, material que será colocado en un tubo de 1.5ml y serán sometidos a una batería de alcoholes (xilol) para realizar la desparafinación. Luego por medio del kit de extracción de ADN genómico y por método de columnas se obtendrá dos pellets que contienen ácidos nucleicos, tanto de la muestra de sangre periférica así como la pieza tumoral; los cuales serán resuspendidos con agua de grado molecular para pasar a la siguiente actividad.

**11.4 Ampliación:**

Se prepara el proceso de PCR convencional, por medio de uso de primers para los 5 marcadores de microsatélites (BAT25, BAT26, D2S125, D5S346 y D17S250) por medio del 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 el producto amplificado de la región específica.

**11.5 Electroforesis por bioanalizador:**

Por medio de reactivos de análisis de ARN para equipo de bioanalizador, chip específico del equipo y software propio, se analizan los patrones del tejido normal (sangre periférica) y tejido tumoral.

**11.6 Analisis de resultado:**

El análisis define la diferencia entre los patrones normal y tumoral; se interpreta como marcador microsatélite estable (MSS) cuando el patrón de ambos es similar y será inestable alto (MSI-H) si existe diferencia en los patrones de por lo menos dos marcadores; según bibliografía (1)(2) y protocolos internos.

**11.7 Elaboración y entrega de resultado:**

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





**PNT.DNCC.INEN. 083 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE DETECCIÓN DE INESTABILIDAD DE MICROSATELITES V0.1**

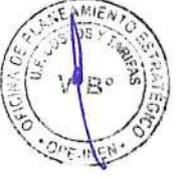
Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento  
Departamento de Patología - Equipo Funcional de Genética y Biología Molecular

**XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. –**

1. Hegde M, Ferber M, Mao R, Samowitz W, Ganguly A, Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). Genet Med. 2014 Jan;16(1):101–16.
2. Ortiz C, Dongo-Pflucker K, Martín-Cruz L, Barletta Carrillo C, Mora-Alferez P, Arias A. Inestabilidad de microsatélites en pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal. Revista de Gastroenterología del Perú. 2016 Jan;36(1):15–22

**XIII. ANEXO. –**

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







PERÚ

Sector  
Salud

Instituto Nacional de  
Enfermedades Neoplásicas



**PNT.DNCC.INEN. 083 PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO DE  
DETECCIÓN DE INESTABILIDAD DE MICROSATELITES V0.1**

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

**ANEXO 1: CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

**CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS**

VERSIÓN	PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA 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	24/02/2020	M.C. A. Pamela Mora Alferez



