Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Nº 262 -2019-DG-INCN

RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Lima, 31 de Diciembre de 2019

VISTOS:

El Expediente N° 19-016502-001 sobre aprobación de las Guías de Procedimientos Médicos del Servicio de Neurogenética, conteniendo el Informe N° 337-2019-INCN-NG del Jefe del Servicio de Neurogenética del Departamento de Investigación, Docencia y Apoyo al Diagnóstico en Neuropatología, el Informe N° 302-2019-INCN-DEIDAEADT de la Directora Ejecutiva de la Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento, el Informe N° 115-2019-UO/OEPE/INCN de la Unidad de Organización de la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico, el Proveído N° 653-2019-OEPE/INCN de la Directora Ejecutiva de la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico y el Informe N° 459-2019-OAJ/INCN del Jefe de la Oficina de Asesoría Jurídica del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, y;

CONSIDERANDO:

Que, el artículo VI del Título Preliminar de la Ley N° 26842, Ley General de Salud, señala que es responsabilidad del Estado promover las condiciones que garanticen una adecuada cobertura de prestaciones de salud a la población, en términos socialmente aceptables de seguridad, oportunidad y calidad;

Que, la Ley Nº 27658, Ley Marco de Modernización de la Gestión del Estado, en su artículo 1° declara al Estado en proceso de modernización en sus diferentes instancias, dependencias, entidades, organizaciones y procedimientos, con la finalidad de mejorar la gestión pública y construir un Estado democrático, descentralizado y al servicio del ciudadano;

Que, el numeral 3.2 del Anexo del Decreto Supremo N° 004-2013-PCM, que aprueba la política de Modernización de la Gestión Pública, establece los "Planes Centrales de la Política de Modernización de la Gestión Pública", siendo la gestión por procesos y la organización institucional uno de ellos, el cual debe implementarse paulatinamente en todas las entidades a fin de brindar a los ciudadanos servicios de manera más eficiente y lograr resultados que los beneficien. Para ello deberán priorizar aquellos de los procesos que sean más relevantes de acuerdo a la demanda ciudadana, a su Plan Estratégico, a sus competencias y los componentes de los programas presupuestales que tuvieran a su cargo, para luego poder organizarse en función de dichos procesos;

Que, mediante Decreto Supremo N° 008-2017-SA se aprobó el Reglamento de Organización y Funciones del Ministerio de Salud (ROF MINSA), y establece en su artículo 126° que los Institutos Especializados son órganos desconcentrados del Ministerio de Salud, dependientes de la Dirección General de Operaciones en Salud. Son responsables de desarrollar las funciones de investigación y docencia en materia de salud, así como servicios de salud altamente especializados en Salud;

Que, mediante Resolución Ministerial N° 1134-2017-MINSA, se aprobó la Directiva Administrativa N° 245-OGPP/MINSA "Lineamientos para la implementación de la gestión por

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

procesos y procedimientos en el Ministerio de Salud", cuyo objetivo es determinar criterios técnicos que orienten y faciliten la implementación de la gestión por procesos y procedimientos en el MINSA, permitiendo mejorar el desempeño a través de resultados previsibles, maximizando el uso de los recursos, alcanzando ciclos de tiempos mínimos en el marco de la Política Nacional de Modernización de la Gestión Pública;

I. TAGLE L.

Que, mediante Decreto Supremo Nº 054-2018-PCM, se aprobó los "Lineamientos de organización del Estado", con la finalidad de buscar que las entidades del Estado, conforme a su tipo, competencias y funciones, se organicen de la mejor manera a fin de responder a las necesidades públicas, en beneficio de la ciudadanía;

Que, mediante Resolución de Secretaría de Gestión Pública N° 006-2018-PCM/SGP, se aprobó la Norma Técnica N° 001-2018-SGP, Norma Técnica para la implementación de la gestión por procesos en las entidades de la administración pública, que tiene por objetivo establecer disposiciones técnicas para la implementación de la gestión por procesos en las entidades de la administración pública;

Que, la Resolución Ministerial N° 850-2016/MINSA aprueba las "Normas para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud" que permitirá estandarizar los elementos conceptuales, estructurales y metodológicos más relevantes en el ciclo de producción normativa del Ministerio de Salud, así como brindar a las instancias reguladoras del Ministerio de Salud una herramienta que facilite el desarrollo de sus funciones normativas;

G. VARGAS

Que, el numeral 6.1.4. de las referidas Normas, consideran Documentos Técnicos aquellos que abordan aspectos como "Doctrinas", "Lineamientos de Políticas", "Sistemas de Gestión de Calidad", "Planes" (de diversa naturaleza). Dicha norma, considera a la Guía Técnica o Manual como el Documento Normativo destinado a regular procesos y/o procedimientos;

A. CARRASCO

Que, el servicio de Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, es el único centro del sistema público de salud del Ministerio de Salud que brinda atención especializada a personas afectadas con enfermedades neurogenéticas. El laboratorio de Neurogenética de nuestro servicio, cuenta con una cartera de procedimientos de genotipificación molecular en apoyo al diagnóstico de las principales enfermedades neurogenéticas atendidas en nuestro centro;

Que, en consecuencia, mediante Informe N° 337-2019-INCN-NG, el Jefe del Servicio de Neurogenética del Departamento de Investigación, Docencia y Apoyo al Diagnóstico en Neuropatología del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, solicita la aprobación Institucional de las Guías de Procedimientos Médicos realizados por el Servicio de Neurogenética:

1. Extracción de ADN a partir de la Sangre Periférica: Tiene por objetivo normar el procedimiento de extracción de ADN a partir de sangre periférica.

2. Prueba Genética para la Enfermedad de Huntington: Tiene por objetivo normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CAG del gen HTT en apoyo al diagnóstico de la Enfermedad de Huntington (EH).

3. Prueba Genética para la Distrofia Miotónica Tipo 1: Tiene por objetivo normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CTG del gen DMPK en apoyo al diagnóstico de la Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1).

4. Prueba Genética para la Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2 (SCA2): Tiene por objetivo normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CAG del gen ATXN2 en apoyo al diagnóstico de la ataxia espinicerebelosa tipo 2 (SCA2).

P. MAZZETTI S

Nº 262 -2019-DG-INCN

RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Lima, 31 de Diciembre de 2019

5. Prueba Genética Panel de Ataxias Hereditarias (SCAS): Tiene por objetivo normar el procedimiento de genotipificación de un panel de ataxias hereditarias dominantes (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, DRPLA, SCA12, SCA17) en apoyo al diagnóstico de las ataxias hereditarias.

6. Prueba Genética para Distonía Tipo DYT1: Tiene por objetivo establecer el procedimiento de la prueba genética para la mutación 904-906delGAG/907-909delGAG del gen TORSINA1A, prueba diagnóstica para la Distonía DYT1.

7. Prueba Genética para Distrofia Muscular de Duchenne por MLPA: Tiene por objetivo normar el procedimiento de análisis de la variación del número de copias del gen DMD a través de la técnica de Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA).

8. Prueba Genética para Neuropatías Hereditarias Sensitivo-Motora por MLPA: Tiene por objetivo normar el procedimiento de análisis de la variación del número de copias del gen PMP22 a través de la técnica de Multiplex Ligation Probe Amplificatión (MLPA).

9. Prueba Genética para Ataxia de Friedreich: Tiene por objetivo normar el procedimiento de genotipificación del microsatélite GAA del gen FXN en apoyo al diagnóstico de la Ataxia de Friedreich.

Que, en ese contexto, mediante Informe N° 115-2019-UO-OEPE/INCN se cuenta con la opinión favorable de la Unidad de Organización de la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico, para la aprobación de las Guías de Procedimientos Médicos del Servicio de Neurogenética; ratificado por la Directora Ejecutiva de la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico, mediante Proveído N° 653-2019-OEPE/INCN;

Que, con el propósito de continuar con el desarrollo de las actividades y procesos técnico-administrativos a nivel Institucional, así como alcanzar los objetivos y metas en el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, resulta pertinente atender la propuesta presentada por el Jefe del Servicio de Neurogenética, aprobando los proyectos de las Guías de Procedimientos Médicos del Servicio de Neurogenética;

Con la opinión favorable del Jefe de la Oficina de Asesoría Jurídica;

Con las visaciones de la Directora Adjunta, de la Directora Ejecutiva de la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico, de la Directora Ejecutiva de la Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento y del Jefe de la Oficina de Asesoría Jurídica del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas;

De conformidad con lo dispuesto por el Texto Único Ordenado de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado por Decreto Supremo N° 004-2019-JUS, Ley N° 26842, Ley General de Salud, la Ley Nº 27658, Ley Marco de Modernización de la Gestión del Estado, Decreto Supremo N° 004-2013-PCM, que aprueba la política de

Modernización de la Gestión Pública, la Resolución Ministerial N° 850-2016/MINSA que aprobó las "Normas para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud" y la Resolución Ministerial N° 787-2006/MINSA, que aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas;

L. TAGLE L.

SE RESUELVE:

Artículo 1°.- APROBAR las Guías de Procedimientos Médicos del Servicio de Neurogenética del Departamento de Investigación, Docencia y Apoyo al Diagnóstico en Neuropatología del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, que en ciento veintidós (122) folios, forma parte de la presente resolución y que a continuación se detallan:

1- Extracción de ADN a partir de la Sangre Periférica.
2- Prueba Genética para la Enfermedad de Huntington.
3- Prueba Genética para la Distrofia Miotónica Tipo 1.
4- Prueba Genética para la Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2 (SCA2).
5- Prueba Genética Panel de Ataxias Hereditarias (SCAS).
6- Prueba Genética para Distonía Tipo DYT1.
7- Prueba Genética para Distrofia Muscular de Duchenne por MLPA.
8- Prueba Genética para Neuropatías Hereditarias Sensitivo-Motora por MLPA.
9- Prueba Genética para Ataxia de Friedreich.

G. VARGAS

Artículo 2°.- ENCARGAR al Jefe del Servicio de Neurogenética del Departamento de Investigación, Docencia y Apoyo al Diagnóstico en Neuropatología del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, como responsable de la difusión, monitoreo, implementación, aplicación y supervisión de las Guías, en el ámbito de su competencia.

A. CARRASCO

Artículo 3°.- ENCARGAR a la Oficina de Comunicaciones la publicación de la presente Resolución Directoral, en el portal de la página web del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

Regístrese y Comuníquese,

MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Dirección General

Med. Clr. Pilar Elena Mazzetti Soler
Directora de Instituto Especializado (e)

Visaciones y copias:
D. Ajdunta
OGC
OAJ

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA

GUÍAS DE PROCEDIMIENTOS MÉDICOS

2019

Neurogenética

Jr. Ancash N° 1271
Barrios Altos, Lima 1 – Perú
Dirección General – Teléfono N° 328-1473
Central Telefónica N° 411-77000
www.incn.gob.pe

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS

DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA

I. TAGLE L.

GUÍAS DE PROCEDIMIENTOS

- ✓ EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA
- ✓ PRUEBA GENÉTICA PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON
- ✓ PRUEBA GENÉTICA PARA LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1
- ✓ PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 2 (SCA2)
- ✓ PRUEBA GENÉTICA PANEL DE ATAXIAS SCAS
- ✓ PRUEBA GENÉTICA PARA DISTONIA TIPO DYT1
- ✓ PRUEBA GENÉTICA PARA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE POR MLPA
- ✓ PRUEBA GENÉTICA PARA CMT1A POR MLPA
- ✓ PRUEBA GENÉTICA PARA ATAXIA DE FRIEDREICH

P. MAZZETTI S.

G. VARGAS

DIRECTORIO:

M.C. ESP. PILAR E. MAZZETTI SOLER
DIRECTORA GENERAL

M.C. ESP. ISABEL B. TAGLE LOSTAUNAU
DIRECTORA ADJUNTA

ING. HÉCTOR R. NÚÑEZ FLORES
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA OFICINA EJECUTIVA DE ADMINISTRACIÓN

LIC. GLORIA A. VARGAS NÚÑEZ
DIRECTORA EJECUTIVA DE LA OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO

M.C. ESP. MYRIAM VELARDE INCHAÚSTEGUI
DIRECTORA EJECUTIVA DE LA DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

M.C. ESP. DIANA RIVAS FRANCHINI
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA

M.C. ESP. MARIO R. CORNEJO OLIVAS
JEFE DEL SERVICIO DE NEUROGENÉTICA

L. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI

Lima, Perú
Agosto 2019

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA Y CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGÉNETICA (CIBN)

MED. ESP. PILAR ELENA MAZZETTI SOLER
MÉDICA NEURÓLOGA

MG. MARÍA VICTORIA MARCA YSABEL
INGENIERA QUÍMICA

BLGO. OLIMPIO ORTEGA DÁVILA
BIÓLOGO GENETISTA

MED. ESP. MARIO REYNALDO CORNEJO OLIVAS
MÉDICO NEURÓLOGO

BLGA. GEN. ANA KARINA MILLA NEYRA
BIÓLOGA GENETISTA

MED. ESP. MARYENELA ILLANES MANRIQUE
MÉDICA PSIQUIATRA

MED. ESP. ELISON HUGO SARAPURA CASTRO
MEDICO NEURÓLOGO

BLGO. ERICK GIANPIERRE FIGEROA ILDEFONSO
BIÓLOGO GENETISTA

BACH. DIANA CUBAS MONTECINO
BACHILLER EN GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

MED. ESP. ZOILA ANDREA RIVERA VALDIVIA
MÉDICA NEURÓLOGA

MED. ESP. JENY YSABEL BAZALAR MONTOYA
MÉDICA GENETISTA

SRTA. SANDRA VANESSA HURTADO ARANDA
APOYO ADMINISTRATIVO

L. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S.

ÍNDICE

1 – EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA		
N°	CONTENIDO	PÁG
	TÍTULO	10
I.	FINALIDAD	10
II.	OBJETIVO	10
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	10
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	10
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	10
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	10
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	10
VI.	REQUERIMIENTOS BÁSICOS	10
	6.1. RECURSOS HUMANOS	10
	6.2. MATERIALES	11
	6.3. SERVICIOS	13
VII.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	13
VIII.	DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO	13
IX.	RECOMENDACIONES	15
X.	ANEXOS	16
	10.1. ANEXO 1	16
	10.2. ANEXO 2	17
XI.	BIBLIOGRAFÍA	19

2 – PRUEBA GENÉTICA PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON		
N°	CONTENIDO	PÁG
	TÍTULO	20
I.	FINALIDAD	20
II.	OBJETIVO	20
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	20
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	20
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	20
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	20
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	20
VI.	REQUERIMIENTOS BÁSICOS	21
	6.1. RECURSOS HUMANOS	21
	6.2. MATERIALES	21
	6.3. SERVICIOS	23
VII.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	23
VIII.	DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO	24
IX.	RECOMENDACIONES	27
X.	ANEXOS	28
	10.1. ANEXO 1	28
	10.2. ANEXO 2	29
	10.3. ANEXO 3	30
	10.4. ANEXO 4	31
XI.	BIBLIOGRAFÍA	33

L. TAGLE L.

A. CARRASCO

F. MAZZETTI S

G. VARGAS

3 – PRUEBA GENÉTICA PARA LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1

N°	CONTENIDO	PÁG
	TÍTULO	34
I.	FINALIDAD	34
II.	OBJETIVO	34
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	34
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	34
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	34
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	34
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	34
VI.	REQUERIMIENTOS BÁSICOS	35
	6.1. RECURSOS HUMANOS	35
	6.2. MATERIALES	35
	6.3. SERVICIOS	37
VII.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	38
VIII.	DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO	38
IX.	RECOMENDACIONES	41
X.	ANEXOS	42
	10.1. ANEXO 1	42
	10.2. ANEXO 2	43
	10.3. ANEXO 3	44
	10.4. ANEXO 4	45
XI.	BIBLIOGRAFÍA	47

4 – PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 2 (SCA2)

N°	CONTENIDO	PÁG
	TÍTULO	48
I.	FINALIDAD	48
II.	OBJETIVO	48
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	48
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	48
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	48
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	48
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	48
VI.	REQUERIMIENTOS BÁSICOS	49
	6.1. RECURSOS HUMANOS	49
	6.2. MATERIALES	49
	6.3. SERVICIOS	51
VII.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	52
VIII.	DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO	52
IX.	RECOMENDACIONES	55
X.	ANEXOS	56
	10.1. ANEXO 1	56
	10.2. ANEXO 2	57
	10.3. ANEXO 3	58
	10.4. ANEXO 4	59
XI.	BIBLIOGRAFÍA	61

5 – PRUEBA GENÉTICA PANEL DE ATAXIAS SCAS

N°	CONTENIDO	PÁG
	TÍTULO	62
I.	FINALIDAD	62
II.	OBJETIVO	62
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	62
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	62
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	62
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	62

L TAGLE L.

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	63
VI.	REQUERIMIENTOS BÁSICOS	63
	6.1. RECURSOS HUMANOS	63
	6.2. MATERIALES	63
	6.3. SERVICIOS	65
VII.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	65
VIII.	DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO	65
IX.	RECOMENDACIONES	67
X.	ANEXOS	68
	10.1. ANEXO 1	68
	10.2. ANEXO 2	69
	10.3. ANEXO 3	70
	10.4. ANEXO 4	71
XI.	BIBLIOGRAFÍA	76

6 – PRUEBA GENÉTICA PARA DISTONIA TIPO DYT1

N°	CONTENIDO	PÁG
	TÍTULO	77
I.	FINALIDAD	77
II.	OBJETIVO	77
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	77
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	77
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	77
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	77
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	77
VI.	REQUERIMIENTOS BÁSICOS	77
	6.1. RECURSOS HUMANOS	77
	6.2. MATERIALES	78
	6.3. SERVICIOS	79
VII.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	80
VIII.	DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO	80
IX.	RECOMENDACIONES	81
X.	ANEXOS	82
	10.1. ANEXO 1	82
	10.2. ANEXO 2	83
	10.3. ANEXO 3	84
	10.4. ANEXO 4	85
XI.	BIBLIOGRAFÍA	87

7 – PRUEBA GENÉTICA PARA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE POR MLPA

N°	CONTENIDO	PÁG
	TÍTULO	88
I.	FINALIDAD	88
II.	OBJETIVO	88
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	88
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	88
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	88
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	88
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	88
VI.	REQUERIMIENTOS BÁSICOS	89
	6.1. RECURSOS HUMANOS	89
	6.2. MATERIALES	89
	6.3. SERVICIOS	91
VII.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	91
VIII.	DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO	91
IX.	RECOMENDACIONES	93
X.	ANEXOS	94
	10.1. ANEXO 1	94
	10.2. ANEXO 2	95

L TAGLE L.

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

	10.3. ANEXO 3	96
	10.4. ANEXO 4	97
	10.5. ANEXO 5	98
XI.	BIBLIOGRAFÍA	99

8 – PRUEBA GENÉTICA PARA CMT1A POR MLPA

N°	CONTENIDO	PÁG
	TÍTULO	100
I.	FINALIDAD	100
II.	OBJETIVO	100
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	100
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	100
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	100
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	100
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	100
VI.	REQUERIMIENTOS BÁSICOS	101
	6.1. RECURSOS HUMANOS	101
	6.2. MATERIALES	101
	6.3. SERVICIOS	103
VII.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	103
VIII.	DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO	103
IX.	RECOMENDACIONES	105
X.	ANEXOS	106
	10.1. ANEXO 1	106
	10.2. ANEXO 2	107
	10.3. ANEXO 3	108
	10.4. ANEXO 4	109
	10.5. ANEXO 5	110
XI.	BIBLIOGRAFÍA	111

9 – PRUEBA GENÉTICA PARA ATAXIA DE FRIEDREICH

N°	CONTENIDO	PÁG
	TÍTULO	112
I.	FINALIDAD	112
II.	OBJETIVO	112
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	112
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	112
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	112
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	112
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	112
VI.	REQUERIMIENTOS BÁSICOS	112
	6.1. RECURSOS HUMANOS	112
	6.2. MATERIALES	113
	6.3. SERVICIOS	114
VII.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	114
VIII.	DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO	114
IX.	RECOMENDACIONES	116
X.	ANEXOS	117
	10.1. ANEXO 1	117
	10.2. ANEXO 2	118
	10.3. ANEXO 3	119
	10.4. ANEXO 4	121
XI.	BIBLIOGRAFÍA	122

L TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

GUÍAS DE PROCEDIMIENTOS MÉDICOS

PRESENTACIÓN

El servicio de Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, es el único centro del sistema público de salud del Ministerio de salud que brinda atención especializada a personas afectadas con enfermedades neurogenéticas.

El laboratorio de Neurogenética de nuestro servicio, cuenta con una cartera de procedimientos de genotipificación molecular en apoyo al diagnóstico de las principales enfermedades neurogenéticas atendidas en nuestro centro.

En cumplimiento de las disposiciones y normativas vigentes del Ministerio de Salud, presentamos la guía técnica de procedimientos del servicio de Neurogenética.

L. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

1 - EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de enfermedades neurogenéticas mediante la extracción de ADN a partir de sangre periférica, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de extracción de ADN a partir de sangre periférica.

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Guía técnica de aplicación obligatoria por el personal del Laboratorio de Neurogenética del Servicio y Centro de Investigación Básica en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

CPT: 83891.01 - EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- Extracción de ADN: procedimiento mediante el cual se obtiene ADN a partir de células o tejidos.
- Consentimiento Informado: Procedimiento mediante el cual se garantiza que el sujeto ha expresado voluntariamente su intención de participar en una prueba genética.

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- Genotipo humano: en el contexto de un estudio molecular, se refiere a los dos alelos o formas heredadas de un gen (o una variante de un gen) especifico de un individuo.
- ADN: ácido Desoxirribonucleico, contiene la información de las características hereditarias y las secuencias para la creación de aminoácidos que generarán proteínas para el funcionamiento de un organismo.

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

- 01 biólogo genetista o con entrenamiento en biología molecular.
- 01 técnico de laboratorio.
- 01 médico genetista.
- 01 médico neurólogo.

L. TAGLE L.

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

6.2. MATERIALES

6.2.1. Reactivos químicos

- Proteinasa K
- Ácido Clorhídrico (HCl)
- Alcohol etílico 96°
- SDS 10%
- Agua tridestilada
- Agarosa
- Tris
- Ácido Bórico
- EDTA 0.5M pH 8.0
- $MgCl_2$
- NaCl
- Qubit™ dsDNA BR Assay Kit
- Safe-Green™ (ABM)
- $CaCl_2$
- Glicerol

6.2.2. Material de plástico

- Tips con filtro de 10 µL, 20uL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL
- Pipetas Pasteur de 3 mL estéril.
- Tubos vacutainer con EDTA-K2 de 10mL
- Tubos de centrífuga 2 mL
- Tubos de 0.2 mL
- Qubit™ Assay Tubes (0.6 mL)
- Tubos Falcon 50 mL
- Pisetas
- Gradilla para tubos de 50mL
- Gradilla para tubos de 10mL
- Gradilla para tubos de 2mL
- Gradillas para tubos de 0.2 mL
- Porta tubos Vacutainer
- Criobox de policarbornat

6.2.3. Material de vidrio

- Matraz aforado de 50mL, 100mL, 500mL y 1L.
- Probeta de 1L.
- Vasos de precipitados de 500 mL.
- Erlenmeyer 250mL
- Pipetas 5 mL y 10 mL.
- Propipeta
- Embudo de filtración

6.2.4. Otros materiales

- Micropipetas 10 µL, 20uL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL
- Papel lente para laboratorio
- Papel aluminio
- Lejía
- Papel toalla
- Mascarilla descartable
- Guantes de nitrilo descartables
- Mandil descartable
- Gorro descartable
- Botas descartables
- Material de escritorio: Bolígrafo, papel bond A4, Cuaderno de laboratorio, sobre manila, marcador indeleble, Tóner para impresora, archivador, sello, tintero para huella digital.
- Aguja hipodérmica 21G 1
- Ligadura
- Gasa estéril 5x5
- Esparadrapo o venditas
- Recipiente de desecho de objetos punzocortantes
- Parafilm
- Magneto
- Extractor de magneto
- Detergente no iónico
- Cuchara para balanza de acero inoxidable
- Pinzas de crisol
- Galonera de descarte

L TAGLE L.

6.2.5. Equipos

- Cámara de electroforesis horizontal profesional (Cleaver Scientific)
- Fuente poder (Biorad)
- Balanza analítica (Shimadzu)
- Sistema de documentación de geles OmniDoci (Cleaver Scientific)
- Incubadora (Memmert)
- Fluorómetro (Qubit – Thermo Fisher)
- pHmetro (Hanna)
- Espectofotómetro (Epoch - Biotek)
- Agitador magnético (Velp)
- Refrigeradora a 4ºC (Thermo Scientific)
- Congeladora a -20°C (Frigidaire)
- Centrífuga para tubos de 50 mL (Boeco)
- Vórtex (Thermolyne)
- Purificador de agua (Thermo Scientific)
- Microondas (Panasonic)
- Computadoras de escritorio

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

- Impresora
- Sistema de alimentación eléctrica ininterrupida (UPS)
- Estabilizador

6.2.6. Software

- Software Gen5TM versión 2.0 (Biotek)
- Software Smart View (Cleaver Scientific)

6.3. SERVICIOS

- Servicios de agua
- Servicio de luz
- Servicio de internet
- Aire acondicionado
- Uso del laboratorio especializado

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Ninguna.

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
	INICIO			
1	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO (de acuerdo a la patología correspondiente)	Documento de Consentimiento Informado firmado	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
2	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
3	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO *Preliquidación* Solicitar la preliquidación del procedimiento *Liquidación* Liquidar el costo del procedimiento o Trámite de aprobación del SIS	 Sello de Preliquidación Boleta de Pago Orden con dos sellos de SIS	 Oficina de Preliquidación Ventanilla CAJA Ventanilla SIS	 Contabilidad Contabilidad SIS
4	REGISTRAR LOS DATOS DEL PACIENTE	Información registrada en base de datos Solicitud de procedimiento molecular	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
5	TOMA DE MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA Colectar 2 tubos de sangre entera de 10 mL en tubos vacutainer con EDTA-K_2. Rotular la siguiente información: CUG, fecha, sexo, CIE-10.	2 tubos de 10mL de sangre periférica codificados.	Área de Toma de Muestra	Servicio de Neurogenética
6	RECEPCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE Verificación de información rotulada con la base de datos *"Genotipificaciones"*: CUG, fecha, sexo, CIE-10. Almacenar a 4 ºC.	Muestra de sangre periférica verificada y almacenada máximo por 7 días a 4°C.	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
7	EXTRAER ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA Para cada tubo de 10 mL de sangre periférica:	Muestra de ADN extraída y resuspendida.	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética

	Aislamiento de linfocitos • Homogenizar los tubos por inversión cuidadosamente y colocar el contenido en un tubo cónico tipo falcon estéril de 50 mL. • Enrazar hasta 50 mL con Solución de Lisis de Glóbulos Rojos (SLR). • Centrifugar a 4000 RPM por 2 minutos. • Eliminar el sobrenadante. • Agregar de 10 a 25 mL de SLR y agitar suavemente hasta eliminar los residuos de glóbulos rojos en el precipitado (aspecto blanquecino). • Eliminar el sobrenadante. • Si el precipitado aún contiene glóbulos rojos (aspecto rojizo), resuspender el precipitado por agitación en 25 mL de SLR. • Centrifugar a 4000 RPM por 1 minuto. **Lisis celular y aislamiento de ADN** • Agregar 5 mL de Solución de Proteinasa K. • Resuspender el precipitado por agitación. • Incubar a 37 °C por 24 horas. • Si aún se observan restos del precipitado (aspecto grumoso), homogenizar e incubar a 37 °C por 24 horas. • Agregar 50 mL de alcohol etílico 96° frio (previamente almacenado a -20 °C). • Homogenizar suavemente hasta observar la formación de un precipitado. • Recuperar el precipitado con una pipeta Pasteur estéril y eliminar el alcohol etílico 96°. • Agregar 50 mL de alcohol etílico 70 °C frio (previamente almacenado a -20 °C). Homogenizar suavemente. • Recuperar el precipitado con una pipeta pasteur estéril y colocarlo en un tubo de centrífuga de 2 mL estéril. • Envolver el tubo de centrífuga en papel toalla. Almacenar a temperatura ambiente hasta la evaporación completa de los restos de alcohol (de 24 a 48 horas). **Resuspensión de ADN** • Resuspender el precipitado en 800 uL de buffer TE low. • Mantener a 37 °C hasta la resuspensión completa.			
8	EVALUAR LA CALIDAD DE ADN Diluir 2uL de ADN stock en 14uL de H_2O_{ddd}. Homogenizar con vortex por 5 segundos.		Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
	• *Cuantificación de ADN con espectrofotometría:* Calibrar el espectrofotómetro con CV<2%. Empleando 2uL de muestra diluida seleccionar el protocolo de cuantificación que considere medidas 230, 260, 280 y 320nm.	[ácidos nucleicos](ng/uL) A260/A280 A230/A260		
	• Cuantificación de ADN con fluorescencia: Calibrar el equipo Qubit con dos muestras control: 0 ng/uL y 100 ng/uL. Empleando 2uL de muestra diluida agregar 198uL de solución de trabajo (199uL de solución Buffer + 1uL de fluoróforo). Realizar la lectura de dsDNA.	[dsDNA](ng/uL)		
	• Integridad de ADN: Agregar 40ng de ADN y 3uL de fluoróforo en un gel de agarosa 0.7%. Revelar fluoróforo con luz azul.	Índice de integridad		
9	ALMACENAMIENTO DEL ADN EXTRAÍDO Almacenar la muestra de ADN extraída y resuspendida a -20°C.	ADN almacenado	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
10	REGISTRO Y REPORTE DE PROCEDIMIENTO • Registrar "ADN disponible" en base de datos "Ingreso de muestras".	Información registrada en base de datos	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
	FIN			

L TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

IX. RECOMENDACIONES

- Todo estudio genético debe ser realizado previo proceso de consentimiento informado que autorice el procedimiento genético de acuerdo a la patología correspondiente.

L TAGLE L.

A. CARRASCO

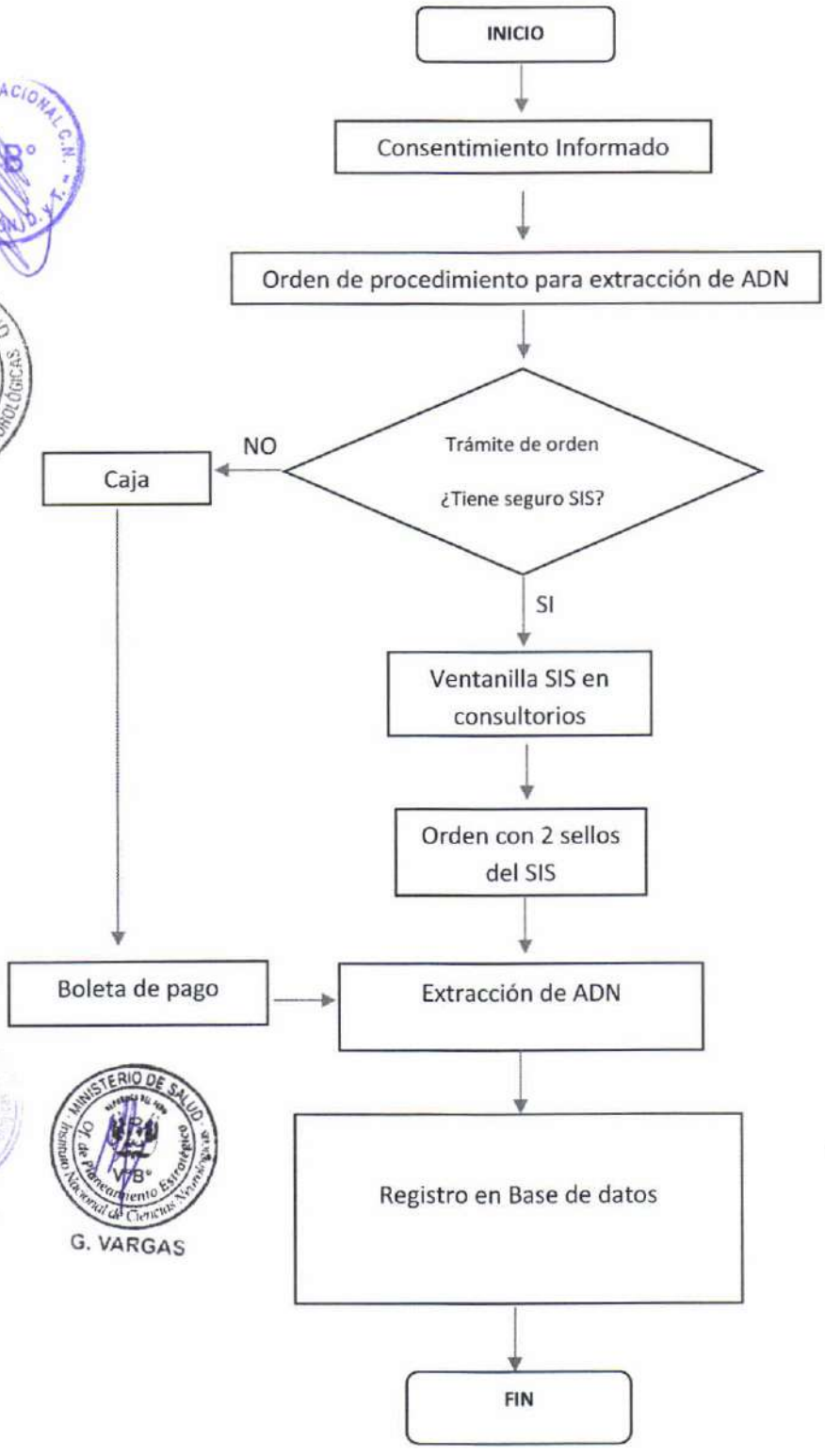
G. VARGAS

P. MAZZETTI S

X. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA



ANEXO 2

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA EL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

Solución de Lisis de Glóbulos Rojos (SLR)	
Tris 2M pH 7.5	5 mL
MgCl 1M	5 mL
NaCl 3M	3.3 mL
Enrasar a 1L con agua tridestilada.	

Solución de Proteinasa K	
Tris HCl 2M pH 8.6	0,25 mL
EDTA 0.5M pH 8,0	0,5 mL
SDS 10%	1 mL
NaCl 3M	3,33 mL
Proteinasa K 20 mg/mL	0,25 mL
Enrasar a 50 mL con agua tridestilada	

Buffer TE Low	
Tris HCl 1M pH 8.0	5 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	200 uL
Enrasar a 100 mL con agua tridestilada.	

TBE 10X	
Tris base	54 mL
Ácido Bórico	27,5 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	200 uL
Enrasar a 500 mL con agua tridestilada.	

Agarosa 0.7%	
Agarosa	0.7 g
TBE 10X	5 mL
Enrasar a 50 mL con agua tridestilada.	

L TAGLE L.

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

Solución de reconstitución de Proteinasa K	
Tris 1M pH 7.5	200 uL
$CaCl_2$ 0.5M	800 uL
Glicerol	10 mL
Enrasar a 20 mL con agua tridestilada.	

Tris HCl 2M pH 7.5: Prepare 100 mL de solución Tris HCl 2M disolviendo 24.22 g de Tris Base en 80 mL de agua tridestilada. Ajuste la solución a un pH de 7.5 agregando HCl gota a gota con una pipeta pasteur limpia y afore a 100 mL.

Tris HCl 2M pH 8.6: Prepare 100 mL de solución Tris HCl 2M disolviendo 24.22 g de Tris Base en 80 mL de agua tridestilada. Ajuste la solución a un pH de 8.6 agregando HCl gota a gota con una pipeta pasteur limpia y afore a 100 mL.

Tris 1M pH 8.0: Prepare 100 mL de solución Tris HCl 1M disolviendo 12.11 g de Tris Base en 80 mL de agua tridestilada. Ajuste la solución a un pH de 8.0 agregando HCl gota a gota con una pipeta pasteur limpia y afore a 100 mL.

NaCl 3M: Prepare 100 mL de solución NaCl 3M disolviendo 17.5 g de NaCl en 80 mL de agua tridestilada. Aforar a 100 mL.

$MgCl_2$ 1M: Prepare 100 mL de solución $MgCl_2$ 1M disolviendo 9.5 g de NaCl en 80 mL de agua tridestilada. Aforar a 100 mL.

$CaCl_2$ 1M: Prepare 20 mL de solución $CaCl_2$ 1M disolviendo 1.1 g de NaCl en 15 mL de agua tridestilada. Aforar a 20 mL.

G. VARGAS

L TAGLE L.

P. MAZZETTI S

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Miller S, Dykes S, Polesky H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16(3):1215.

2. Kalousová M, Levová K, Kuběna AA, Jáchymová M, Franková V, Zima T. Comparison of DNA isolation using salting-out procedure and automated isolation (MagNA system). Prep Biochem Biotechnol. 2017 Aug 9;47(7):703-708.

G. VARGAS

L TAGLE L.

P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 15548 - RNE

2 - PRUEBA GENÉTICA PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Huntington (EH), a través de una guía técnica para la genotipificación del número repeticiones CAG del gen *HTT*, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *HTT* en apoyo al diagnóstico de la Enfermedad de Huntington (EH).

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Guía técnica de aplicación obligatoria por el personal del Laboratorio de Neurogenética del Servicio y Centro de Investigación Básica en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

CPT: 81416 - PRUEBA GENÉTICA PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- Genotipificación del gen *HTT*: proceso de la determinación del genotipo de un individuo con respecto al número de repeticiones CAG en el gen *HTT*.
- Consentimiento Informado: Procedimiento mediante el cual se garantiza que el sujeto ha expresado voluntariamente su intención de participar en una prueba genética.

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, procedimiento mediante el cual se amplifica (obtienen muchas copias) de ADN y permite cuantificar repeticiones de tres nucleótidos hasta un rango determinado.
- TP-PCR: método cualitativo el cual puede detectar mayor o menor cantidad de un rango específico de repeticiones de tres nucleótidos.
- Electroforesis capilar: Técnica utilizada para separar las diferentes moléculas presentes en una disolución de acuerdo con la relación masa/carga de las mismas.
- Nucleótido: es una molécula que es la unidad estructural básica y el bloque de construcción del ADN y/o ARN, una de sus partes es una base nitrogenada las cuales pueden ser adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) o uracilo (U).
- Genotipo humano: en el contexto de un estudio molecular, se refiere a los dos alelos o formas heredadas de un gen (o una variante de un gen) especifico de un individuo.
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico, contiene la información de las características hereditarias y las secuencias para la creación de aminoácidos que generarán proteínas para el funcionamiento de un organismo.

L TAGLE L.

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

- 01 biólogo genetista o con entrenamiento en biología molecular.
- 01 técnico de laboratorio.
- 01 médico genetista.
- 01 médico neurólogo.

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

- dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- DMSO 100% (Sigma-Aldrich)
- Agua ultrapura libre de nucleasa
- HD3: 5´-6-FAM-CCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTT-3´
- HD5: 5´-CGGCGGTGGCGGCTGTTG-3´
- HD-TP-F:5´-6-FAM-ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCC-3´
- HD-TP-R: 5'-CGGTGGCGGCTGTTGCTGCTGCTGCTGCTG-3'
- Long PCR Enzyme mix 5 U/µL (Thermo Scientific). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl2 25 mM.
- Platinum® Taq DNA polymerase 5 U/µL (Invitrogen). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl2 50 mM.
- Marcador de peso molecular de 10 pb (Invitrogen)
- GeneScan LIZ 500 dye Size Standard
- Hi-Di Formamide
- SeqStudio Genetic Analyzer Cartridge
- SeqStudioTM Cathode Buffer Container
- SeqStudio Integrated Capillary Protector

I. TAGLE L.

6.2.2. Reactivos químicos

- Acrilamida
- Bisacrilamida
- Nitrato de Plata
- TEMED
- Persulfato de amonio
- Tris base
- Ácido bórico
- EDTA 0.5M pH 8
- Xilencianol
- Azul de Bromofenol
- Glicerol
- Formamida
- Etanol absoluto
- Ácido acético
- Hidróxido de sodio
- Formaldehído 37%

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias N... gica
Departamento de Gen... patología
Diana Rivas Franchin
Jefe del Dpto. de Neuroge...
C.M. P. 155... - RNE ...

6.2.3. Material de plástico

- Tips con filtro 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL
- Tubos de PCR de tapa plana 0.2 mL
- Tubos de PCR de tapa cónica 0.2 mL
- Microamp™ 8-Tube Strip, 0.2mL
- Microamp™ 8-Cap Strip
- Tubos de centrífuga 2 mL
- Gradilla para tubos de 0.2 mL
- Gradilla para tubos de 2 mL
- Pisetas
- MicroAmp® 96-Well Tray/Retainer Set
- Estación congelada para PCR
- Placa de cultivo de 96 pocillos
- Soporte para micropipetas
- Septa for 0.2 mL MicroAmp tubes
- Cathode Buffer Container Reservoir Septa for SeqStudio Genetic Analyzer

6.2.4. Material de vidrio

- Matraz aforado de 500 mL.
- Probeta de 1000 mL.
- Vasos de precipitados de 50 mL.
- Pipeta de vidrio de 10 mL
- Pipeta de vidrio de 25 mL.
- Propipetas
- Baguetas
- Frasco transparente de 500 mL, 1 L y 4 L.
- Frasco color caramelo de 200 mL.

L. TAGLE L.

6.2.5. Otros materiales

- Micropipetas 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL.
- Papel lente para laboratorio
- Papel aluminio
- Lejía
- Papel toalla
- Parafilm
- Mascarilla descartable
- Guantes de nitrilo descartables
- Mandil descartable
- Gorro descartable
- Botas descartables
- Material de escritorio: Bolígrafo, forro de plástico, papel bond A4, Cuaderno de laboratorio, sobre manila, marcador indeleble, Tóner para impresora, archivador, sello, tintero para huella digital.
- DNAZap PCR DNA Degradation Solutions

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rojas Francisco
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 15548 - RNE

- Accesorios para electroforesis: Peine de 24 pocillos, separadores de 1mm y vidrios con muesca y sin muesca, cables de fuente de energía.

6.2.6. Equipos

- Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- Analizador genético SeqStudio™ (Applied Biosystems)
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- Sistema de documentación de geles OmniDoci (Cleaver Scientific)
- Cabina de PCR (ESCO®)
- Cámara de electroforesis vertical profesional (Cleaver)
- Fuente poder (Cleaver)
- Balanza analítica (Shimadzu)
- Agitador magnético (Velp)
- Refrigeradores a 4ºC (Thermo Scientific)
- Refrigeradores a 4ºC (Miray)
- Congeladora a -20°C (Miray)
- Picocentrífuga
- Vórtex
- Cronómetro
- Computadoras de escritorio
- Impresora
- Sistema de alimentación eléctrica ininterrupida
- Estabilizador

6.2.7. Software

- Plate manager (Applied Biosystems)
- GeneMapper™ Software 5 (Applied Biosystems)
- Gen5TM versión 2.0 (Biotek)

I. TAGLE L.

6.3. SERVICIOS

- Servicios de agua
- Servicio de luz
- Servicio de internet
- Aire acondicionado
- Uso del laboratorio especializado

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Este procedimiento requiere uso de un equipo de alto costo "analizador genético", imprescindible para la determinación del tamaño de repeticiones CAG del gen *HTT*. Este estudio requiere que se incluya un procedimiento TP-PCR para descartar casos de homoalelismo en el gen *HTT*.

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Anatomía patológica

Diana Rivas Frantchin
Jefe del Dpto. de Neuropatología

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
		INICIO		
1	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO	Documento de Consentimiento Informado firmado	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
2	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
3	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO *Preliquidación* Solicitar la preliquidación del procedimiento *Liquidación* Liquidar el costo del procedimiento o Trámite de aprobación del SIS	Sello de Preliquidación Boleta de Pago Orden con dos sellos de SIS	Oficina de Preliquidación Ventanilla CAJA Ventanilla SIS	Contabilidad Contabilidad SIS
4	REGISTRAR LOS DATOS DEL PACIENTE	Información registrada en base de datos Solicitud de procedimiento molecular	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
5	EXTRACCIÓN DE ADN (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN	Alícuota de ADN con concentración 10 ng/uL	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
7	GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG POR PCR Para cada paciente se analizarán 2 muestras de ADN genómico obtenidas independientemente. Además, se empleará una muestra problema, un estándar de secuencia específica y una muestra blanco. *Amplificación del microsatélite CAG del gen HTT* Preparar 10 uL de mezcla por cada reacción con las siguientes concentraciones finales: • DMSO 7% • Buffer de PCR para enzima Taq Platinum 1X • dNTPs 0.05mM c/u • $MgCl_2$ 1mM • Cebador HD3 0.4uM • Cebador HD5 0.4uM • Enzima Taq Platinum 0.04 U/uL • ADN 1ng/uL Enrasar a 10uL con agua ultrapura. Emplear el siguiente programa de amplificación: 2 minutos de denaturación inicial a 95°C, 28 ciclos de denaturación a 95°C por 1 minuto, hibridación a 65°C por 30 segundos, y extensión a 75°C por 45 segundos; seguido por un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos. *Visualización de productos de PCR por electroforesis en gel de poliacrilamida* Preparar un gel de poliacrilamida al 8% no denaturante para la electroforesis de los productos de PCR. Sembrar en cada pocillo 2uL de producto de PCR con 2uL de buffer de siembra. Además, se debe sembrar en un	Genotipo para los alelos de microsatélites CAG	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética

pocillo 1uL marcador de peso molecular de 10pb con 2uL de buffer de siembra. Administrar un voltaje de 200 V por 30 minutos. Realizar tinción argéntica del gel usando solución de fijación, solución de tinción y solución de revelado. Verificar que las muestras hayan sido amplificadas correctamente.

Preparación de placa de fragmentos usando Termociclador SimpleAmp

En tubos de PCR proceder con los siguientes pasos:

Preparar una mezcla de 9.35 µL de Formamida, 0.15 µL Marcador GeneScan™ 500 LIZ, por cada muestra, analizada, estándar de secuencia específica para HD y blanco a evaluarse.

Dispensar 9.5 µL de la mezcla en cada tubo de la placa. Añadir 1 µL del producto de amplificación obtenido en las reacciones de PCR fluorescente.

Desnaturalizar las muestras a 98°C por 5 minutos.

Guardar los tubos de PCR a 4°C hasta introducirlos en el analizador genético (periodos menores a 24 horas) o -20ºC (periodos mayores a 24 horas).

Electroforesis capilar usando Analizador genético SeqStudio™

Una vez preparados los tubos de PCR, los productos de las reacciones deben ser sometidos a electroforesis capilar. Se emplearán las condiciones recomendadas por el fabricante. Usando el Software Plate manager se ingresa la información de la placa para que sea reconocida por el analizador genético. Para programar las condiciones de electroforesis capilar se debe tener en cuenta que los cebadores empleados están marcados con 6-FAM y que el patrón de peso molecular está marcado con GeneScan™ 500 LIZ.

Análisis de resultados y estimación del número de repeticiones

Empleando el programa GeneMapper™, analizar los fragmentos generados. El resultado será un electroferograma con picos de intensidad determinada y separados de manera proporcional a la longitud del fragmento.

NOTA: Los productos de PCR de microsatélites tienen una migración más rápida que el ADNss debido al alto contenido de GC por lo que realizar la estimación del número de repeticiones CAG empleando un marcador de peso molecular comercial puede derivar en errores de cálculo.

Para calcular el número de repeticiones de un alelo desconocido, se debe comparar el electoferograma obtenido empleando el estándar de secuencia específica para HD y los electroferogramas obtenidos por cada muestra analizada.

GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG POR TP-PCR

Este procedimiento se utiliza sólo para la resolución de probable homocigosidad. El resultado es cualitativo, sólo determina la presencia o ausencia de un alelo mutado

L. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Dra. Nivia Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología

mayor a 40 repeticiones CAG que mediante PCR no fue detectado.

Amplificación por TP-PCR usando termociclador Proflex
Preparar la siguiente mezcla de reacción para una muestra control positiva para *HTT*, una muestra control negativa para *HTT*, una muestra problema y una muestra blanco.

En la cabina de PCR, preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra:
DMSO 4%
Buffer de PCR 1X para enzima Long PCR
dNTPs 0.2mM c/u
$MgCl_2$ 2.3mM
Cebador HD-TP-F 0.1M
Cebador HD-TP-R 0.1uM
Enzima Long PCR DNA polimerasa 0.07 U/uL
ADN 0.5ng/uL

Emplear el siguiente programa de amplificación: 5 minutos de denaturación inicial a 94°C, seguido de 10 ciclos de denaturación por 10 segundos a 96°, 4 min, seguido de 20 ciclos (variación de 2 seg x ciclo) de 20 segundos a 94°C, hibridación por 4 min a 68°C, y un paso de extensión final a 68°C por 10 minutos.

Visualización de productos de PCR por electroforesis en geles de poliacrilamida
Preparar un gel de poliacrilamida al 10% no denaturante para la electroforesis de los productos de PCR.
Sembrar en cada pocillo 4uL de producto de PCR con 3uL de buffer de siembra. Además, se debe colocar un 0.7 uL marcador de peso molecular de 10pb con 2uL de buffer de siembra.
Administrar un voltaje de 200 V por 1 hora.
Realizar tinción argéntica del gel usando solución de fijación, solución de tinción y solución de revelado.
Verificar que las muestras hayan sido amplificadas correctamente.

Preparación de la placa de fragmentos usando Termociclador Proflex
Emplear el protocolo descrito para la preparación de la placa de fragmentos para productos de PCR.
Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador.

Electroforesis capilar usando el analizador genético SeqStudio™
Usando el Software Plate manager se ingresa la información de la placa para que sea reconocida por el analizador genético.
Una vez preparada la placa, las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar.
Se empleará el protocolo descrito para la electroforesis capilar de placa de fragmentos para productos de PCR.

Análisis de resultados
Por TP-PCR se puede diferenciar alelos de gran tamaño que por PCR no pudieron detectarse debido a su gran tamaño. Se debe evaluar el perfil del electroferograma generado. Se determina como alelo expandido cuando el

L. TAGLE L.

P. MAZZETTI S.

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Frentchin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 15588 - RNE 1556

	patrón de picos supera los 165pb			
8	REGISTRO Y REPORTE DE PROCEDIMIENTO Registrar "Reporte de laboratorio a disposición" en base de datos "Genotipificaciones".	Información registrada en base de datos y Reporte de genotipificación para EH	Laboratorio de Neurogenética (biólogo genetista y medico genetista)	Servicio de Neurogenética
FIN				

IX. RECOMENDACIONES

- Todo estudio genético debe ser realizado previo proceso de consentimiento informado que autorice el procedimiento genético.
- La solicitud de la prueba genética y la entrega del reporte de resultado, debe realizarse directamente con la persona afectada en el contexto de una evaluación médica y de asesoramiento genético que incluye evaluación pre-test, test y post-test.

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

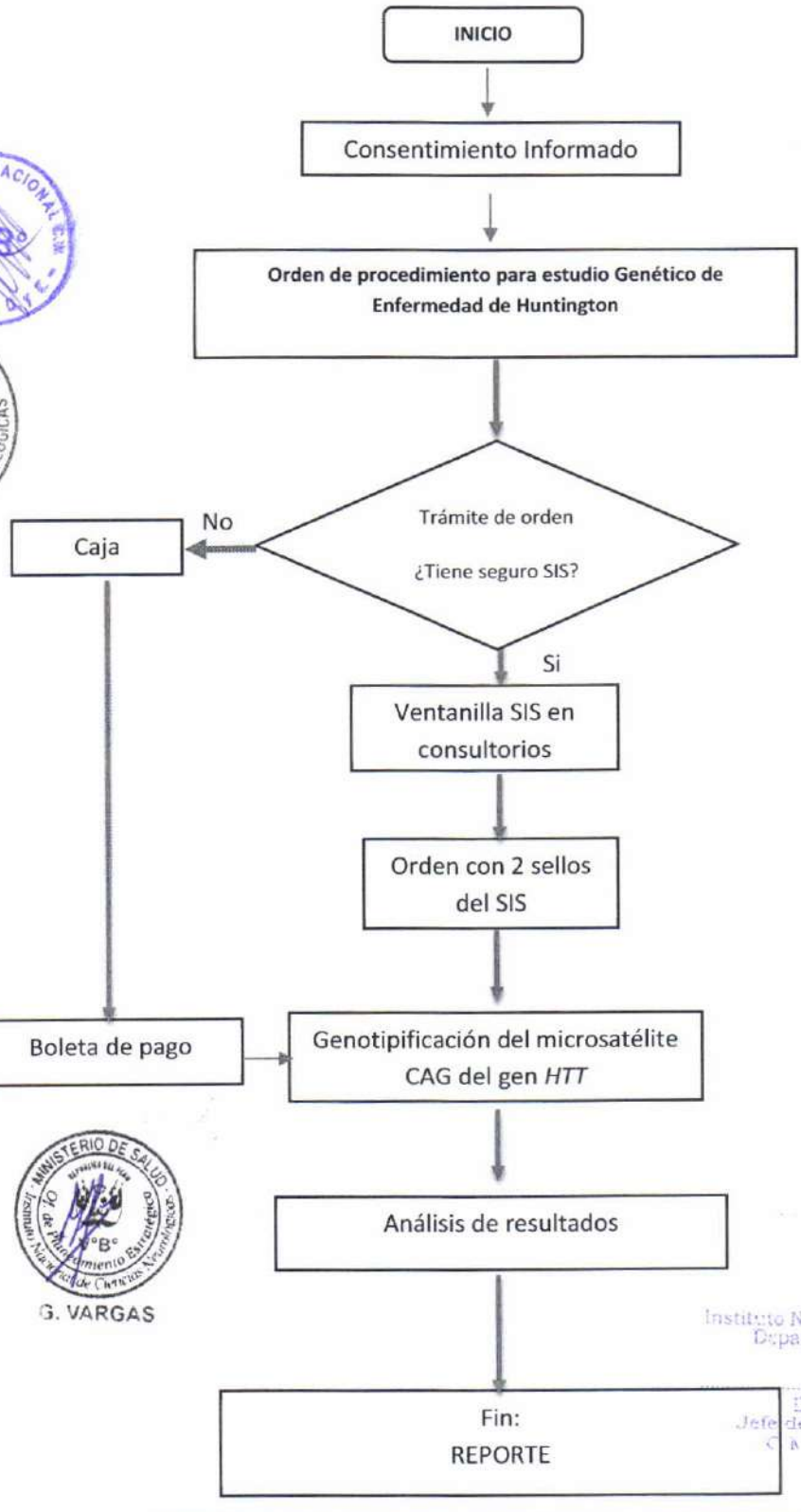
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Anatomía Patológica

Blgte. Nivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuro[illegible]

X. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON



I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16568 - RNE 7556

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

El ADN es la sustancia que se encuentra en nuestras células y controla tanto su funcionamiento como la herencia. En el laboratorio de Neurogenética del Centro de Investigación Básica en Neurogenética (CIBN) del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), hacemos exámenes que nos permiten encontrar cambios en el ADN, llamados mutaciones. Se requiere una muestra de sangre, de hisopado bucal u otros tejidos para obtener el ADN, según la solicitud del médico tratante. La muestra será empleada exclusivamente para estudio genético relacionado con su enfermedad. No nos es posible emplear su muestra para otros exámenes como hemoglobina, glucosa, etc. Identificar los cambios o mutaciones en el ADN puede tomar varios meses.

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

El estudio genético nos permitirá conocer el diagnóstico preciso de su enfermedad y poder darle así una atención más específica; así como también una orientación sobre su evolución, pronóstico y posible tratamiento. También le permitirá tomar decisiones de vida con la información más adecuada.

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

El resultado puede confirmar su enfermedad, descartarla o algunas veces ser incierto o poco claro; en este último caso, no podríamos precisar el diagnóstico. La entrega de resultados se realiza como parte de una consulta especial donde le daremos información sobre su enfermedad y los riesgos para Usted y su familia, es por ello que no informamos resultados por teléfono. En el tiempo que se le haya indicado que demore el procesamiento de su muestra, Ud. debe coordinar una cita para entrega de resultados y/o asesoría genética.

¿Cuáles son las molestias y riesgos para Ud. al realizar el estudio genético?

Las molestias que Ud. sentirá en la obtención de sangre será algo de dolor por el pinchazo de la aguja y rara vez podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja o bien una infección en la zona de punción. En este último caso, será atendido por personal de la institución sin costo adicional. Al conocer el resultado, esta información podría ocasionarle preocupación y temor por las consecuencias personales, familiares, laborales y sociales de llevar una enfermedad hereditaria, para lo cual se le brindará apoyo y orientación en consultas especiales de asesoría. Igualmente, si otras personas saben que uno tiene una enfermedad hereditaria, otros miembros de la familia o las personas alrededor de uno pueden discriminarnos.

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

He sido informado(a) acerca de la posibilidad de realizarme un estudio genético y he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias acerca del procedimiento; estoy satisfecho(a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1. Que se me extraiga una muestra para estudio genético de:
   Genotipificación del gen:
2. Que se me informe el resultado
3. Que se almacene mi muestra de ADN en el Banco de ADN del CIBN.

Nombre completo:

DNI:

Firma: ______________________________

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

Yo como responsable del solicitante, doy consentimiento para el estudio genético.

Nombre completo:

DNI:

Firma: ______________________________

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo: ______________________________

DNI: ______________________________

Fecha y hora: ______________________________

Firma: ______________________________

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S.

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología

ANEXO 3

FORMATO DE REPORTE DE RESULTADO PARA PRUEBA GENÉTICA DE EH

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas — Neurogenética

LABORATORIO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA
PRUEBA GENÉTICA PARA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON. N° -EH-

Nombres y Apellidos:	
Fecha de nacimiento	Código de la muestra:
Sexo:	Método de obtención:
Status clínico:	Remitente:
Tipo de muestra:	Fecha de obtención:
Estado de la muestra:	Fecha de emisión de resultado:

Individuo es enviado para estudio molecular por diagnóstico clínico o riesgo de 50% de presentar Enfermedad de Huntington.

RESULTADO MOLECULAR

Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.
Presencia de un alelo con repeticiones encima del rango de normalidad.

Alelo 1: repeticiones CAG.
Alelo 2: repeticiones CAG.

INTERPRETACIÓN

El diagnóstico molecular de la enfermedad de Huntington se define por el número de repeticiones CAG del alelo más largo:

Alelos normales: ≤26 repeticiones CAG.
Alelos normales mutables: 27 a 35 repeticiones CAG, no presentan enfermedad, sin embargo, podrían transmitir rango patológico a descendencia.
Alelos penetrancia reducida: 36 a 39 repeticiones CAG, podrían o no manifestar la enfermedad.
Alelos de penetrancia completa, patológico: A partir de 40 o más repeticiones, las personas que poseen estos alelos manifiestan o manifestarán la enfermedad.

I. TAGLE L.

PROCEDIMIENTO

El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones el exón 1 del gen de *HTT* consiste en la amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia y electroforesis capilar en Analizador genético SeqStudio™ (Applied Biosystems) empleando protocolo optimizado en Laboratorio de Neurogenética.
La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1, los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.

CONCLUSIONES

- El resultado excluye/confirma el diagnóstico de (portador de la) Enfermedad de Huntington.
- Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
- Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

Fecha de entrega de reporte a paciente:

G. VARGAS

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.pe

Jr. Ancash Nº 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 15548 - RNE 2358

ANEXO 4

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA PRUEBA GENÉTICA PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Poliacrilamida 21%	
Acrilamida	20 g
Bisacrilamida	1 g
Enrasar a 100 mL con agua tridestilada.	

TBE 10X	
Tris base	54 mL
Ácido Bórico	27,5 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	200 uL
Enrasar a 500 mL con agua tridestilada.	

TBE 1X	
TBE 10x	100 mL
Agua tridestilada	900 mL

Poliacrilamida 8% (V=18 mL)	
Poliacrilamida 21%	6.9 mL
TBE 10x	1.8 mL
Agua tridestilada	9.3 mL
APS 10%	150 uL
TEMED	15 uL

Poliacrilamida 10% (V=18 mL)	
Poliacrilamida 21%	8.6 mL
TBE 10x	1.8 mL
Agua tridestilada	7.6 mL
APS 10%	150 uL
TEMED	15 uL

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16568 - RNE 556

Ladder de 10pb	
Ladder de 10pb	2 uL
Agua tridestilada	8 uL

Mix de cebadores HD-PCR 20uM	
HD3 (100uM)	10 uL
HD5 (100uM)	10 uL
Agua ultrapura	30 uL

Mix de cebadores HD-TP-PCR 20uM	
HD-TP-F (100uM)	10 uL
HD-TP-R (100uM)	10 uL
Agua ultrapura	30 uL

Mix de dNTPs 10mM (2.5mM c/u)	
Adenina – A (100 mM)	2.5 uL
Timina – T (100 mM)	2.5 uL
Guanina – G (100 mM)	2.5 uL
Citosina – C (100 mM)	2.5 uL
Agua ultrapura	90 uL

I. TAGLE L.

Soluciones de Tinción argéntica

Solución A: Prepare 450 mL de **solución A** agregando 30 mL de alcohol etílico de 96º y 1 mL de ácido acético y afore a 450 mL con agua tridestilada.

Solución B: Prepare 150 mL de **solución B** disolviendo 0.3g de nitrato de plata en 150 mL de agua tridestilada.

P. MAZZETTI S.

Solución C: Prepare 450 mL de **solución C** disolviendo 3g de hidróxido de sodio y 1 mL de formaldehído al 37% y afore a 450 mL con agua tridestilada.

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuro[illegible]
C.M. P. 1555-9 - RNE 2356

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Jama, Mohamed et al. (2013). Triplet Repeat Primed PCR Simplifies Testing for Huntington Disease. The Journal of Molecular Diagnostics, Volume 15, Issue 2, 255 – 262.

2. Goldberg YP, Andrew SE, Clarke LA, Hayden MR. A PCR method for accurate assessment of trinucleotide repeat expansion in Huntington disease. Hum Mol Genet. junio de 1993;2(6):635-6.

3. Andrew SE, Goldberg YP, Theilmann J, Zeisler J, Hayden MR. A CCG repeat polymorphism adjacent to the CAG repeat in the Huntington disease gene: implications for diagnostic accuracy and predictive testing. Hum Mol Genet. Enero de 1994;3(1):65-7.

4. ACMG/ASHG statement. Laboratory guidelines for Huntington disease genetic testing. The American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Huntington Disease Genetic Testing Working Group. Am J Hum Genet. Mayo de 1998;62(5):1243-7.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias N... ...gicas
Departamento de Neu... patología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropat...
C.M.P. 15548 - RNE 7556

3 - PRUEBA GENÉTICA PARA LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1 (DM1)

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de la Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1), a través de una guía técnica para la genotipificación del número de repeticiones CTG del gen *DMPK*, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CTG del gen *DMPK* en apoyo al diagnóstico de la Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1).

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Guía técnica de aplicación obligatoria por el personal del Laboratorio de Neurogenética del Servicio y Centro de Investigación en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

CPT: 81419 - PRUEBA GENÉTICA PARA LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1 (DM1)

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1): Desorden sistémico autosómico dominante, ocasionado por la expansión anormal del triplete CTG (Citosina-Timina-Guanina) en la región 3' no codificante del gen *DMPK (*19q13.32).
- Genotipificación del gen *DMPK*: proceso de la determinación del genotipo de un individuo con respecto al número de repeticiones CTG en el gen *DMPK*.
- Consentimiento Informado: Procedimiento mediante el cual se garantiza que el sujeto ha expresado voluntariamente su intención de participar en una prueba genética.

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- TP-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con cebador de triplete repetido.
- Electroforesis capilar: Técnica utilizada para separar las diferentes moléculas presentes en una disolución de acuerdo con la relación masa/carga de las mismas.
- Nucleótido: es una molécula que es la unidad estructural básica y el bloque de construcción del ADN y/o ARN, una de sus partes es una base nitrogenada las cuales pueden ser adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) o uracilo (U).
- Genotipo humano: en el contexto de un estudio molecular, se refiere a los dos alelos o formas heredadas de un gen (o una variante de un gen) especifico de un individuo.
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico, contiene la información de las características hereditarias y las secuencias para la creación de aminoácidos que generarán proteínas para el funcionamiento de un organismo.

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

- 01 biólogo genetista o con entrenamiento en biología molecular.
- 01 técnico de laboratorio.
- 01 médico genetista.
- 01 médico neurólogo.

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

- Cebador P1: 5'-AGAAAGAAATGGTTCTGTGATCCC -3'
- Cebador P2: 5'-6-FAM-GAACGGGGCTCGAAGGGTCCTTGTAGCCG -3'
- Cebador P3R: 5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACG -3'
- Cebador P4CAG-3: 5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACGCAGCAGCAGCAGCAGCA-3'
- Amplitaq Gold 360 ® DNA polymerase 5 U/µL (Applied BiosystemsTM). Incluye: Buffer PCR 10x, MgCl2 25 mM y 360 CG Enhancer 100%
- dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- DMSO 100% (Sigma-Aldrich)
- Agua ultrapura libre de nucleasa
- Long PCR Enzyme mix 5 U/µL (Thermo Scientific). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl2 25 mM.
- Marcador de peso molecular de 10 pb (Invitrogen)
- GeneScan LIZ 500 dye Size Standard
- Hi-Di Formamide
- SeqStudio Genetic Analyzer Cartridge
- SeqStudioTM Cathode Buffer Container
- SeqStudio Integrated Capillary Protector

6.2.2. Reactivos químicos

- Acrilamida
- Bisacrilamida
- Nitrato de Plata
- TEMED
- Persulfato de amonio
- Tris base
- Ácido bórico
- EDTA 0.5M pH 8
- Xilencianol
- Azul de Bromofenol
- Glicerol
- Formamida
- Etanol absoluto
- Ácido acético
- Hidróxido de sodio

L. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16543 - RNE 7656

- Formaldehído 37%

6.2.3. Material de plástico

- Micropipetas 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL.
- Tips con filtro 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL
- Tubos de PCR de tapa plana 0.2 mL
- Tubos de PCR de tapa cónica 0.2 mL
- MicroampTM 8-Tube Strip, 0.2mL
- MicroampTM 8-Cap Strip
- Tubos de centrífuga 2 mL
- Gradilla para tubos de 0.2 mL
- Gradilla para tubos de 2 mL
- Pisetas
- MicroAmp® 96-Well Tray/Retainer Set
- Estación congelada para PCR
- Placa de cultivo de 96 pocillos
- Soporte para micropipetas
- Septa for 0.2 mL MicroAmp tubes
- Cathode Buffer Container Reservoir Septa for SeqStudio Genetic Analyzer

6.2.4. Material de vidrio

- Matraz aforado de 500 mL.
- Probeta de 1000 mL.
- Vasos de precipitados de 50 mL.
- Pipeta de vidrio de 10 mL
- Pipeta de vidrio de 25 mL.
- Propipetas
- Baguetas
- Frasco transparente de 500 mL, 1 L y 4 L.
- Frasco color caramelo de 200 mL.

I. TAGLE L.

6.2.5. Otros materiales

- Papel lente para laboratorio
- Papel aluminio
- Lejía
- Papel toalla
- Parafilm
- Mascarilla descartable
- Guantes de nitrilo descartables
- Mandil descartable
- Gorro descartable
- Botas descartables

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548 - RNE 7656

- Material de escritorio: Bolígrafo, forro de plástico, papel bond A4, Cuaderno de laboratorio, sobre manila, marcador indeleble, Tóner para impresora, archivador, sello, tintero para huella digital.
- DNAZap PCR DNA Degradation Solutions
- Accesorios para electroforesis: Peine de 24 pocillos, separadores de 1mm y vidrios con muesca y sin muesca, cables de fuente de energía.

6.2.6. Equipos

- Termociclador Veriti (Applied Biosystems)
- Analizador genético SeqStudio™ (Applied Biosystems)
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- Sistema de documentación de geles OmniDoci (Cleaver Scientific)
- Cabina de PCR (ESCO®)
- Cámara de electroforesis vertical profesional (Cleaver)
- Fuente poder (Cleaver)
- Balanza analítica (Shimadzu)
- Agitador magnético (Velp)
- Refrigeradores a 4ºC (Thermo Scientific)
- Refrigeradores a 4ºC (Miray)
- Congeladora a -20°C (Miray)
- Picocentrífuga
- Vórtex
- Cronómetro
- Computadoras de escritorio
- Impresora
- Sistema de alimentación eléctrica ininterrupida
- Estabilizador

I. TAGLE L.

6.2.7. Software

- Plate manager (Applied Biosystems)
- GeneMapper™ Software 5 (Applied Biosystems)
- Gen5™ versión 2.0 (Biotek)

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

6.3. SERVICIOS

- Servicios de agua
- Servicio de luz
- Servicio de internet
- Aire acondicionado
- Uso del laboratorio especializado

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548 - RNE 9556

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Este procedimiento requiere uso de un equipo de alto costo "analizador genético", imprescindible para la determinación del tamaño de repeticiones CTG del gen *DMPK*. Este estudio requiere que se incluya un procedimiento TP-PCR para descartar casos de homoalelismo en el gen *DMPK*.

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
	INICIO			
1	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO	Documento de Consentimiento Informado firmado	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
2	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
3	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO *Preliquidación* Solicitar la preliquidación del procedimiento *Liquidación* Liquidar el costo del procedimiento o Trámite de aprobación del SIS	 Sello de Preliquidación Boleta de Pago Orden con dos sellos de SIS	 Oficina de Preliquidación Ventanilla CAJA Ventanilla SIS	 Contabilidad Contabilidad SIS
4	REGISTRAR LOS DATOS DEL PACIENTE	Información registrada en base de datos Solicitud de procedimiento molecular	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
5	EXTRACCIÓN DE ADN (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN	Alícuota de ADN con concentración 20 ng/uL	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
7	GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CTG POR PCR Para cada paciente se analizarán 2 muestras de ADN genómico obtenidas independientemente. Además, se empleará una muestra problema, un estándar de secuencia específica y una muestra blanco. *Amplificación del microsatélite CTG del gen DMPK* Preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales: • 360 GC Enhancer 10% • Buffer de PCR para enzima Amplitaq Gold® 360 1X • dNTPs 0.2mM c/u • MgCl2 1.25mM • Cebador P1 0.75uM • Cebador P2 0.75uM • Enzima Amplitaq Gold 360 0.08 U/uL • ADN 4ng/uL Enrasar a 10uL con agua ultrapura. Emplear el siguiente programa de amplificación: 2 minutos de denaturación inicial a 94°C, 30 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, hibridación a 60°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 1 minuto; seguido por un	Genotipo para los alelos del microsatélite CTG	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 35548 - RNE 7656

L. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Visualización de productos de PCR por electroforesis en gel de poliacrilamida

Preparar un gel de poliacrilamida al 8% no denaturante para la electroforesis de los productos de PCR. Sembrar en cada pocillo 1uL de producto de PCR con 1uL de buffer de siembra. Además, se debe colocar un 0.85uL marcador de peso molecular de 10pb con 1uL de buffer de siembra. Administrar un voltaje de 200 V por 45 minutos. Realizar la tinción del gel con el protocolo de tinción argéntica usando solución de nitrato de plata. Verificar la adecuada amplificación de las muestras problema.

Preparación de placa de fragmentos usando Termociclador Veriti

En una placa compatible con el equipo proceder con los siguientes pasos:
Preparar una mezcla de 9.35 µL de Formamida 0.15 µL Marcador GeneScan™ 500 LIZ, por cada muestra, control y muestra blanco a evaluarse.
Dispensar 9.5 µL de la mezcla en cada pocillo de la placa.
Añadir 1 µL del producto de amplificación obtenido en las reacciones de PCR.
Desnaturalizar las muestras a 98°C por 5 minutos.
Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador (periodos menores a 24 horas) o -20ºC (periodos mayores a 24 horas).

Electroforesis capilar usando Analizador genético SeqStudio™

Una vez preparada la placa, los productos de las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar. Se emplearán las condiciones recomendadas por el fabricante. Usando el Software Plate manager se ingresa la información de la placa para que sea reconocida por el analizador genético.
Para programar las condiciones de electroforesis capilar se debe tener en cuenta que el rango de amplificación varía entre 100 a 500 pb, los cebadores empleados están marcados con 6-FAM y que el patrón de peso molecular está marcado con GeneScanTM 500 LIZ.

Análisis de resultados y estimación del número de repeticiones

Empleando el programa GeneMapper™, analizar el tamaño de los fragmentos generados. El resultado será un electroferograma con picos de intensidad determinada y separados de manera proporcional al tamaño del fragmento.

La estimación del número de repeticiones CTG se realizará comparando los resultados obtenidos en la muestra control con los electroferogramas de las muestras problema. La muestra control consta de 5 alelos de repeticiones conocidas: 5, 11, 13, 14 y 21 CTG.

GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CTG POR TP-PCR

Este procedimiento es complementario a la PCR convencional. Se aplica en casos que resultan aparentemente homocigotos por PCR.

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuro[illegible]
C.M. P. 16548 - RNE [illegible]

El resultado es cualitativo, sólo determina la presencia o ausencia de un alelo mutado mayor a 50 repeticiones CTG que la PCR no pudo detectar.

Amplificación por TP-PCR usando termociclador Veriti:
Preparar la siguiente mezcla de reacción para una muestra control positiva para DM1, una muestra control negativa para DM1, una muestra problema y un control de PCR.
En la cabina de PCR, preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra:
DMSO 4%
Buffer de PCR 1X para enzima taq Long PCR
dNTPs 0.25mM c/u
MgCl2 1.25mM
Cebador P2 2uM
Cebador P4CAG 0.4uM
Cebador P3R 2uM
Enzima Long PCR DNA polimerasa 0.1 U/uL
ADN 4ng/uL

Emplear el siguiente programa de amplificación: 5 minutos de denaturación inicial a 94°C, seguido de 10 ciclos de denaturación por 10 segundos a 96°, un segundo paso de hibridación-elongación por 4 minutos a 68°C, seguido de 20 ciclos de 20 segundos a 94°C, hibridación-elongación por 4 minutos a 68°C. Agregando dos segundos por cada ciclo de amplificación, y un paso de extensión final a 68°C por 10 minutos.

Visualización de productos de PCR por electroforesis en geles de poliacrilamida
Preparar un gel de poliacrilamida al 10% no denaturante para la electroforesis de los productos de PCR. Sembrar en cada pocillo 3uL de producto de PCR con 5uL de buffer de siembra. Además, se debe colocar un 0.85 uL marcador de peso molecular de 10pb con 3uL de buffer de siembra. Administrar un voltaje de 200 V por 60 minutos. Realizar la tinción del gel con el protocolo de tinción argéntica usando solución de nitrato de plata. Verificar que las muestran hayan sido amplificadas correctamente

Preparación de la placa de fragmentos usando Termociclador Veriti:
Emplear el protocolo descrito para la preparación de la placa de fragmentos para productos de PCR. Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador (periodos menores a 24 horas) o -20ºC (periodos mayores a 24 horas).

Electroforesis capilar usando el analizador genético SeqStudio™
Usando el Software Plate manager se ingresa la información de la placa para que sea reconocida por el analizador genético. Una vez preparada la placa, las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar. Se empleará el protocolo descrito para la electroforesis capilar de placa de fragmentos para productos de PCR.

Análisis de resultados
Por TP-PCR se puede diferenciar alelos de gran tamaño que por PCR no pudieron detectarse

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Kivus Franchim
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.S. P. 16548 - RNE 7556

	debido a su gran tamaño. Se debe evaluar el perfil del electroferograma generado. Se determina como alelo expandido cuando el patrón de picos supera los 201 pb.			
8	REGISTRO Y REPORTE DE PROCEDIMIENTO • Registrar "Reporte de laboratorio a disposición" en base de datos "Genotipificaciones".	Información registrada en base de datos y Reporte de genotipificación para DM1	Laboratorio de Neurogenética (biólogo genetista y medico genetista)	Servicio de Neurogenética
FIN				

IX. RECOMENDACIONES

- Todo estudio genético debe ser realizado previo proceso de consentimiento informado que autorice el procedimiento genético.
- La solicitud de la prueba genética y la entrega del reporte de resultado, debe realizarse directamente con la persona afectada en el contexto de una evaluación médica y de asesoramiento genético que incluye evaluación pre-test, test y post-test.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

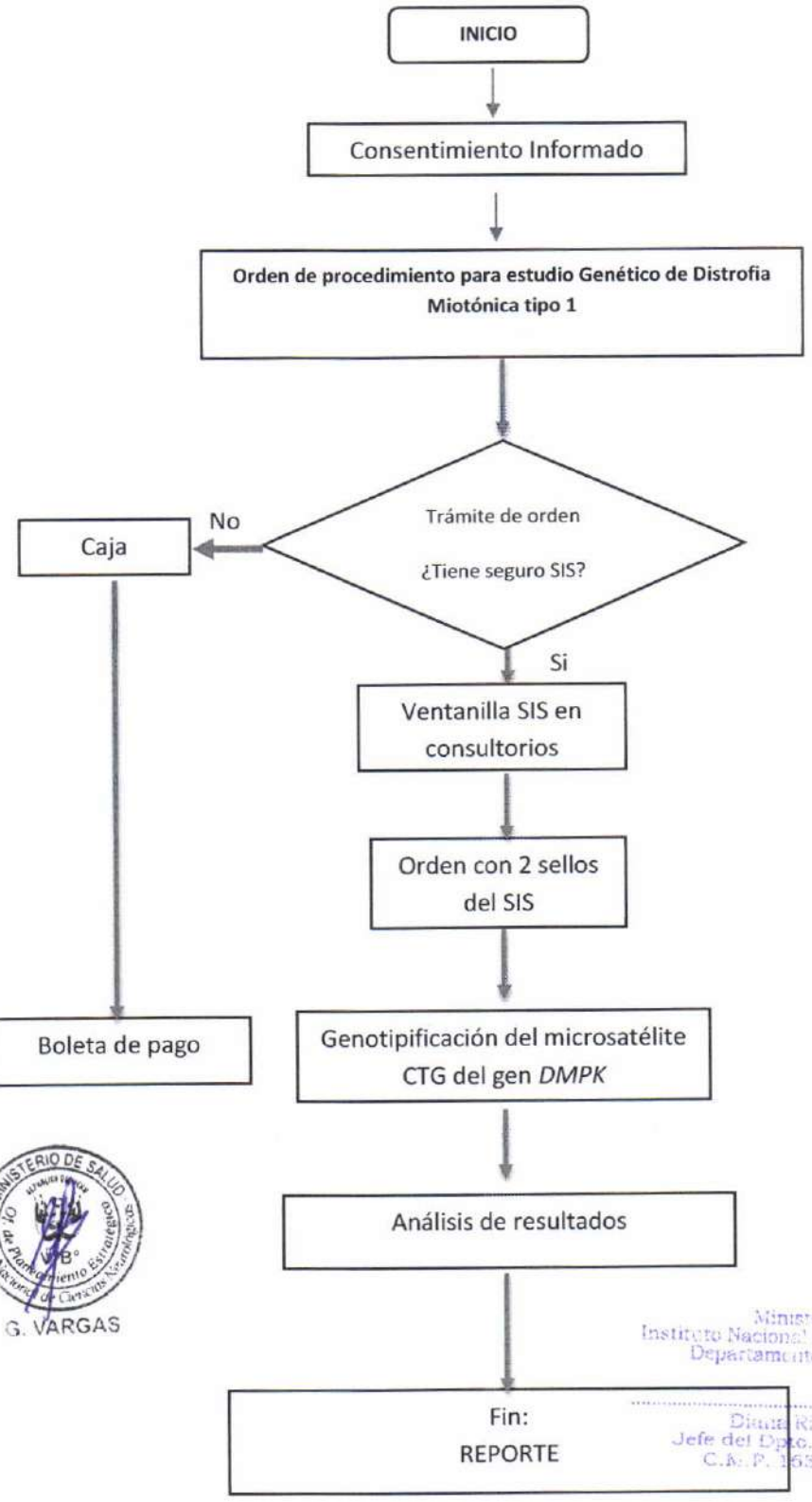
P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Anatomía patológica
Diana Kivas Frauchin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548 - RNE 7356

X. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1



ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

El ADN es la sustancia que se encuentra en nuestras células y controla tanto su funcionamiento como la herencia. En el laboratorio de Neurogenética del Centro de Investigación Básica en Neurogenética (CIBN) del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), hacemos exámenes que nos permiten encontrar cambios en el ADN, llamados mutaciones. Se requiere una muestra de sangre, de hisopado bucal u otros tejidos para obtener el ADN, según la solicitud del médico tratante. La muestra será empleada exclusivamente para estudio genético relacionado con su enfermedad. No nos es posible emplear su muestra para otros exámenes como hemoglobina, glucosa, etc. Identificar los cambios o mutaciones en el ADN puede tomar varios meses.

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

El estudio genético nos permitirá conocer el diagnóstico preciso de su enfermedad y poder darle así una atención más específica; así como también una orientación sobre su evolución, pronóstico y posible tratamiento. También le permitirá tomar decisiones de vida con la información más adecuada.

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

El resultado puede confirmar su enfermedad, descartarla o algunas veces ser incierto o poco claro; en este último caso, no podríamos precisar el diagnóstico. La entrega de resultados se realiza como parte de una consulta especial donde le daremos información sobre su enfermedad y los riesgos para Usted y su familia, es por ello que no informamos resultados por teléfono. En el tiempo que se le haya indicado que demore el procesamiento de su muestra, Ud. debe coordinar una cita para entrega de resultados y/o asesoría genética.

¿Cuáles son las molestias y riesgos para Ud. al realizar el estudio genético?

Las molestias que Ud. sentirá en la obtención de sangre será algo de dolor por el pinchazo de la aguja y rara vez podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja o bien una infección en la zona de punción. En este último caso, será atendido por personal de la institución sin costo adicional. Al conocer el resultado, esta información podría ocasionarle preocupación y temor por las consecuencias personales, familiares, laborales y sociales de llevar una enfermedad hereditaria, para lo cual se le brindará apoyo y orientación en consultas especiales de asesoría. Igualmente, si otras personas saben que uno tiene una enfermedad hereditaria, otros miembros de la familia o las personas alrededor de uno pueden discriminarnos.

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

He sido informado(a) acerca de la posibilidad de realizarme un estudio genético y he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias acerca del procedimiento; estoy satisfecho(a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1. Que se me extraiga una muestra para estudio genético de:
   Genotipificación del gen:
2. Que se me informe el resultado
3. Que se almacene mi muestra de ADN en el Banco de ADN del CIBN.

Nombre completo:

DNI:

Firma: ____________________

I. TAGLE L.

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

Yo como responsable del solicitante, doy consentimiento para el estudio genético.

Nombre completo:

DNI:

Firma: ____________________

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo: ____________________

DNI: ____________________

Fecha y hora: ____________________

Firma: ____________________

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Jr. Ancash N°1271 Lima Cercado, Perú

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548

ANEXO 3

FORMATO DE REPORTE DE RESULTADO PARA PRUEBA GENÉTICA DE DM1

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas — Neurogenética

LABORATORIO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA - INCN
RESULTADO DE ANÁLISIS MOLECULAR PARA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1 (DM1)

Nombres y Apellidos:			
Fecha de nacimiento		Código de la muestra:	
Sexo:		Método de obtención:	
Status clínico:		Remitente:	
Tipo de muestra:		Fecha de obtención:	
Estado de la muestra:		Fecha de emisión de resultado:	

Paciente es enviado para estudio molecular por diagnóstico clínico de Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1).

RESULTADO MOLECULAR

Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.
Presencia de un alelo con repeticiones encima del rango de normalidad.

Alelo 1: repeticiones CTG.
Alelo 2: repeticiones CTG.

INTERPRETACIÓN

El diagnóstico molecular de la distrofia miotónica tipo 1 (DM1) se define por el número de repeticiones CTG del alelo más largo en el gen DMPK:

Alelos normales: hasta 34 repeticiones CTG.
Alelos normales mutables: rango de 35 a 49 repeticiones CTG. No presentan enfermedad, sin embargo, podrían transmitir rango patológico a descendencia
Alelos de penetrancia completa, patológicos: A partir de 50 o más repeticiones CTG. Las personas que poseen estos alelos manifiestan o manifestarán la enfermedad.

PROCEDIMIENTO

El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones en el gen de *DMPK* consiste en la amplificación por PCR en tiempo final y la determinación del número de tripletes (hasta 50 repeticiones CTG) mediante regresión lineal a partir de electroforesis en gel de poliacrilamida. Discriminación de la ausencia o presencia del alelo mutado mayor o igual a 50 repeticiones CTG, por la técnica de TP-PCR. Método optimizado e implementado internamente 1,2.

CONCLUSIONES

- El resultado excluye/confirma el diagnóstico de Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1).
- Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
- Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.

1. Milla-Neyra, K. (2015). Implementación de una metodología basada en la combinación de las técnicas de PCR y TP-PCR para el diagnóstico molecular de la Distrofia Miotónica tipo 1 en el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas en el año 2014.
2. Kamsteeg, E. J., Kress, W., Catalli, C., Hertz, J. M., Witsch-Baumgartner, M., Buckley, M. F., ... Scheffer, H. (2012). Best practice guidelines and recommendations on the molecular diagnosis of myotonic dystrophy types 1 and 2. European journal of human genetics: EJHG, 20(12), 1203–1208. doi:10.1038/ejhg.2012.108

Fecha de entrega de reporte a paciente:

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.pe

Jr. Ancash Nº 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

I. TAGLE L.
P. MAZZETTI S
A. CARRASCO
G. VARGAS

ANEXO 4

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA PRUEBA GENÉTICA PARA LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1

Poliacrilamida 21%	
Acrilamida	20 g
Bisacrilamida	1 g
Enrasar a 100 mL con agua tridestilada.	

TBE 10X	
Tris base	54 mL
Ácido Bórico	27,5 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	200 uL
Enrasar a 500 mL con agua tridestilada.	

TBE 1X	
TBE 10x	100 mL
Agua tridestilada	900 mL

Poliacrilamida 8% (V=18 mL)	
Poliacrilamida 21%	6.9 mL
TBE 10x	1.8 mL
Agua tridestilada	9.3 mL
APS 10%	150 uL
TEMED	15 uL

I. TAGLE L.

Poliacrilamida 10% (V=18 mL)	
Poliacrilamida 21%	8.6 mL
TBE 10x	1.8 mL
Agua tridestilada	7.6 mL
APS 10%	150 uL
TEMED	15 uL

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

Ladder de 10pb	
Ladder de 10pb	2 uL

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548 - RNE [illegible]

Agua tridestilada	8 uL

Mix de cebadores DM1-PCR 20uM	
DMPK-P1 (100uM)	10 uL
DMPK-P2 (100uM)	10 uL
Agua ultrapura	30 uL

Mix de dNTPs 10mM (2.5mM c/u)	
Adenina – A (100 mM)	2.5 uL
Timina – T (100 mM)	2.5 uL
Guanina – G (100 mM)	2.5 uL
Citosina – C (100 mM)	2.5 uL
Agua ultrapura	90 uL

Soluciones de Tinción argéntica

Solución A: Prepare 450 mL de **solución A** agregando 30 mL de alcohol etílico de 96º y 1 mL de ácido acético y afore a 450 mL con agua tridestilada.

Solución B: Prepare 150 mL de **solución B** disolviendo 0.3g de nitrato de plata en 150 mL de agua tridestilada.

Solución C: Prepare 450 mL de **solución C** disolviendo 3g de hidróxido de sodio y 1 mL de formaldehído al 37% y afore a 450 mL con agua tridestilada.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 155-8 - RNE

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Milla-Neyra, K. (2015). Implementación de una metodología basada en la combinación de las técnicas de PCR y TP-PCR para el diagnóstico molecular de la Distrofia Miotónica tipo 1 en el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas en el año 2014.

2. Kamsteeg, E. J., Kress, W., Catalli, C., Hertz, J. M., Witsch-Baumgartner, M., Buckley, M. F., ... Scheffer, H. (2012). Best practice guidelines and recommendations on the molecular diagnosis of myotonic dystrophy types 1 and 2. European journal of human genetics: EJHG, 20(12), 1203–1208. doi:10.1038/ejhg.2012.108

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchun
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16548 - RNE

4 - PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 2 (SCA2)

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2), a través de una guía técnica para la genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *ATXN2*, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *ATXN2* en apoyo al diagnóstico de la ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2).

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Guía técnica de aplicación obligatoria por el personal del laboratorio de neurogenética del Servicio y Centro de Investigación en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESYTANDARIZAR

CPT: 81479 - PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 2 (SCA2)

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- Consentimiento Informado: Procedimiento mediante el cual se garantiza que el sujeto ha expresado voluntariamente su intención de participar en una prueba genética.
- Genotipificación del gen *ATXN2*: proceso de la determinación del genotipo de un individuo con respecto al número de repeticiones CAG en el gen ATXN2.

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, procedimiento mediante el cual se amplifica (obtienen muchas copias) de ADN y permite cuantificar repeticiones de tres nucleótidos hasta un rango determinado.
- TP-PCR: método cualitativo el cual puede detectar mayor o menor cantidad de un rango específico de repeticiones de tres nucleótidos.
- Electroforesis capilar: Técnica utilizada para separar las diferentes moléculas presentes en una disolución de acuerdo con la relación masa/carga de las mismas.
- Nucleótido: es una molécula que es la unidad estructural básica y el bloque de construcción del ADN y/o ARN, una de sus partes es una base nitrogenada las cuales pueden ser adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) o uracilo (U).
- Genotipo humano: en el contexto de un estudio molecular, se refiere a los dos alelos o formas heredadas de un gen (o una variante de un gen) especifico de un individuo.

- ADN: Ácido Desoxirribonucleico, contiene la información de las características hereditarias y las secuencias para la creación de aminoácidos que generarán proteínas para el funcionamiento de un organismo.

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

- 01 biólogo genetista o con entrenamiento en biología molecular.
- 01 técnico de laboratorio.
- 01 médico genetista.
- 01 médico neurólogo.

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

- Cebador 2A: 5'-GGGCCCCTCACCATGTCG-3'
- Cebador 2B: 5'-CGGGCTTGCGGACATTGG-3'
- Cebador R1: 5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACGCTGCTGCTGCTGCTG-3'
- Cebador R2: 5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACG-3'
- dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- DMSO 100% (Sigma-Aldrich)
- Agua ultrapura libre de nucleasa
- Long PCR Enzyme mix 5 U/µL (Thermo Scientific). Incluye: Buffer PCR 10x y $MgCl_2$ 25 mM.
- Platinum® Taq DNA polymerase 5 U/µL (Invitrogen). Incluye: Buffer PCR 10x y $MgCl_2$ 50 mM.
- Marcador de peso molecular de 10 pb (Invitrogen)
- GeneScan LIZ 500 dye Size Standard
- Hi-Di Formamide
- SeqStudio Genetic Analyzer Cartridge
- SeqStudio™ Cathode Buffer Container

I. TAGLE L.

6.2.2. Reactivos químicos

- Acrilamida
- Bisacrilamida
- Nitrato de Plata
- TEMED
- Persulfato de amonio
- Tris base
- Ácido bórico
- EDTA 0.5M pH 8
- Xilencianol
- Azul de Bromofenol
- Glicerol
- Formamida

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Nivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuro...
C.M.P. 15648 - RNE ...

- Etanol absoluto
- Ácido acético
- Hidróxido de sodio
- Formaldehído 37%

6.2.3. Material de plástico

- Micropipetas 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL.
- Tips con filtro 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL
- Tubos de PCR de tapa plana 0.2 mL
- Tubos de PCR de tapa cónica 0.2 mL
- Microamp™ 8-Tube Strip, 0.2mL
- Microamp™ 8-Cap Strip
- Tubos de centrífuga 2 mL
- Gradilla para tubos de 0.2 mL
- Gradilla para tubos de 2 mL
- Pisetas
- MicroAmp® 96-Well Tray/Retainer Set
- Estación congelada para PCR
- Placa de cultivo de 96 pocillos
- Soporte para micropipetas
- Septa for 0.2 mL MicroAmp tubes
- Cathode Buffer Container Reservoir Septa for SeqStudio Genetic Analyzer

6.2.4. Material de vidrio

- Matraz aforado de 500 mL.
- Probeta de 1000 mL.
- Vasos de precipitados de 50 mL.
- Pipeta de vidrio de 10 mL
- Pipeta de vidrio de 25 mL.
- Propipetas
- Baguetas
- Frasco transparente de 500 mL, 1 L y 4 L.
- Frasco color caramelo de 200 mL.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

6.2.5. Otros materiales

- Papel lente para laboratorio
- Papel aluminio
- Lejía
- Papel toalla
- Parafilm
- Mascarilla descartable
- Guantes de nitrilo descartables
- Mandil descartable
- Gorro descartable

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuro...

- Botas descartables
- Material de escritorio: Bolígrafo, forro de plástico, papel bond A4, Cuaderno de laboratorio, sobre manila, marcador indeleble, Tóner para impresora, archivador, sello, tintero para huella digital.
- DNAZap PCR DNA Degradation Solutions
- Accesorios para electroforesis: Peine de 24 pocillos, separadores de 1mm y vidrios con muesca y sin muesca, cables de fuente de energía.

6.2.6. Equipos

- Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- Analizador genético SeqStudio™ (Applied Biosystems)
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- Sistema de documentación de geles OmniDoci (Cleaver Scientific)
- Cabina de PCR (ESCO®)
- Cámara de electroforesis vertical profesional (Cleaver)
- Fuente poder (Cleaver)
- Balanza analítica (Shimadzu)
- Agitador magnético (Velp)
- Refrigeradores a 4ºC (Thermo Scientific)
- Refrigeradores a 4ºC (Miray)
- Congeladora a -20°C (Miray)
- Picocentrífuga
- Vórtex
- Cronómetro
- Computadoras de escritorio
- Impresora
- Sistema de alimentación eléctrica ininterrupida
- Estabilizador

I. TAGLE L.

6.2.7. Software

- Plate manager (Applied Biosystems)
- GeneMapper™ Software 5 (Applied Biosystems)
- Gen5TM versión 2.0 (Biotek)

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

6.3. SERVICIOS

- Servicios de agua
- Servicio de luz
- Servicio de internet
- Aire acondicionado
- Uso del laboratorio especializado

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16548 - RNE 7656

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Este procedimiento requiere uso de un equipo de alto costo "analizador genético", imprescindible para la determinación del tamaño de repeticiones CAG del gen *ATXN2*. Este estudio requiere que se incluya un procedimiento TP-PCR para descartar casos de homoalelismo (en el gen *ATXN2* existe hasta 90% de homocigotos para el alelo 22).

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
	INICIO			
1	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO	Documento de Consentimiento Informado firmado	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
2	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
3	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO *Preliquidación* Solicitar la preliquidación del procedimiento *Liquidación* Liquidar el costo del procedimiento o Trámite de aprobación del SIS	 Sello de Preliquidación Boleta de Pago Orden con dos sellos de SIS	 Oficina de Preliquidación Ventanilla CAJA Ventanilla SIS	 Contabilidad Contabilidad SIS
4	REGISTRAR LOS DATOS DEL PACIENTE	Información registrada en base de datos Solicitud de procedimiento molecular	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
5	EXTRACCIÓN DE ADN (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN	Alícuota de ADN con concentración 10 ng/uL	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
7	GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG POR PCR Preparar la siguiente mezcla de reacción para una muestra problema, una muestra control y una muestra blanco: *Amplificación del microsatélite CAG del gen ATXN2* En la cabina de PCR, preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra: • DMSO 5% • Buffer de PCR para enzima taq platinum 1X • dNTPs 0.05mM c/u • $MgCl_2$ 0.75mM • Cebador SCA2-A 0.5uM • Cebador SCA2-B 0.5uM • Enzima taq platinum 0.04 U/uL • ADN 2ng/uL Emplear el siguiente programa de amplificación: 2 minutos de denaturación inicial a 94°C, 28 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, hibridación a 64°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos; seguido por un paso de extensión final a 72°C	Genotipo para los alelos del microsatélite CAG	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuro[illegible]
C.M.P. 16548 - RNE [illegible]

por 7 minutos.

Visualización de productos de PCR por electroforesis en gel de poliacrilamida
Preparar un gel de poliacrilamida al 6% no denaturante para la electroforesis de los productos de PCR. Sembrar en cada pocillo 2uL de producto de PCR con 2uL de buffer de siembra. Además, se debe colocar un 0.7 uL marcador de peso molecular de 10pb con 2uL de buffer de siembra. Administrar un voltaje de 150 V por 30 minutos. Realizar la tinción del gel con el protocolo de tinción argéntica usando solución de nitrato de plata. Verificar que las muestran hayan sido amplificadas correctamente.

Preparación de placa de fragmentos usando Termociclador Proflex
En una placa compatible con el equipo proceder con los siguientes pasos: Preparar una mezcla de 18 µL de Formamida 0.5 µL Marcador GeneScanTM 500 LIZ, por cada muestra, control y muestra blanco a evaluarse. Dispensar 18.5 µL de la mezcla en cada pocillo de la placa. Añadir 1 µL del ADN obtenido en las reacciones de PCR. Denaturalizar las muestras a 98°C por 5 minutos. Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador.

Electroforesis capilar usando Analizador genético SeqStudio™
Una vez preparada la placa, los productos de las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar. Se emplearán las condiciones recomendadas por el fabricante. Usando el Software Plate manager se ingresa la información de la placa para que sea reconocida por el analizador genético. Para programar las condiciones de electroforesis capilar se debe tener en cuenta que el rango de amplificación varía entre 100 a 500 pb, los cebadores empleados están marcados con 6-FAM y que el patrón de peso molecular está marcado con GeneScanTM 500 LIZ.

Análisis de resultados y estimación del número de repeticiones
Empleando el programa GeneMapper™, analizar el tamaño de los fragmentos generados. El resultado será un electroferograma con picos de intensidad determinada y separados de manera proporcional al tamaño del fragmento.

NOTA: Los productos de PCR de microsatélites tienen una migración más rápida que el ADNss debido al alto contenido de GC por lo que realizar la estimación del número de repeticiones CAG empleando un marcador de peso molecular comercial puede derivar en errores de cálculo.

Para calcular el número de repeticiones de un alelo desconocido, se debe comparar el electoferograma obtenido empleando el estándar de secuencia específica para SCA2 y los electroferogramas obtenidos por cada muestra analizada.

GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG POR TP-PCR
Este procedimiento es complementario a la PCR convencional. Se aplica en casos que

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Eliana Rivas Fracchia
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548 - RNE 3656

resultan aparentemente homocigotos por PCR. El resultado es cualitativo, sólo determina la presencia o ausencia de un alelo mutado mayor a 31 repeticiones CAG que la PCR no pudo detectar.

Amplificación por TP-PCR usando termociclador Proflex:
Preparar la siguiente mezcla de reacción para una muestra control positiva para SCA2, una muestra control negativa para SCA2, una muestra problema y una muestra blanco:

En la cabina de PCR, preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra:
DMSO 4%
Buffer de PCR 1X para enzima taq Long PCR
dNTPs 0.2mM c/u
MgCl2 2.3mM
Cebador SCA2-A 0.1M
Cebador SCA2-R2 0.1uM
Cebador SCA2-R1 0.01uM
Enzima Long PCR DNA polimerasa 0.07 U/uL
ADN 0.5ng/uL

Emplear el siguiente programa de amplificación: 3 minutos de denaturación inicial a 94°C, seguido de 10 ciclos de denaturación por 20 segundos a 96°, un segundo paso de hibridación-elongación por 45 segundos a 68°C, seguido de 20 ciclos de 20 segundos a 96°C, hibridación por 30 segundos a 60°C y extensión por 45 segundos a 68°C, y un paso de extensión final a 68°C por 10 minutos.

Visualización de productos de PCR por electroforesis en geles de poliacrilamida
Preparar un gel de poliacrilamida al 10% no denaturante para la electroforesis de los productos de PCR. Sembrar en cada pocillo 2uL de producto de PCR con 2uL de buffer de siembra. Además, se debe colocar un 0.7 uL marcador de peso molecular de 10pb con 2uL de buffer de siembra. Administrar un voltaje de 150 V por 45 minutos. Realizar la tinción del gel con el protocolo de tinción argéntica usando solución de nitrato de plata. Verificar que las muestran hayan sido amplificadas correctamente

Preparación de la placa de fragmentos usando Termociclador Proflex
Emplear el protocolo descrito para la preparación de la placa de fragmentos para productos de PCR. Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador.

Electroforesis capilar usando el analizador genético SeqStudioTM
Usando el Software Plate manager se ingresa la información de la placa para que sea reconocida por el analizador genético. Una vez preparada la placa, las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar. Se empleará el protocolo descrito para la electroforesis capilar de placa de fragmentos para productos de PCR.

Análisis de resultados
Por TP-PCR se puede diferenciar alelos de gran tamaño que por PCR no pudieron detectarse

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16548 - RNE 3656

	debido a su gran tamaño. Se debe evaluar el perfil del electroferograma generado. Se determina como alelo expandido cuando el patrón de picos supera los 148 pb			
8	REGISTRO Y REPORTE DE PROCEDIMIENTO • Registrar "Reporte de laboratorio a disposición" en base de datos "Genotipificaciones".	Información registrada en base de datos y Reporte de genotipificación para SCA2	Laboratorio de Neurogenética (biologo genetista y medico genetista)	Servicio de Neurogenética
FIN				

IX. RECOMENDACIONES

- Todo estudio genético debe ser realizado previo proceso de consentimiento informado que autorice el procedimiento genético.
- La solicitud de la prueba genética y la entrega del reporte de resultado, debe realizarse directamente con la persona afectada en el contexto de una evaluación médica y de asesoramiento genético que incluye evaluación pre-test, test y post-test.

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

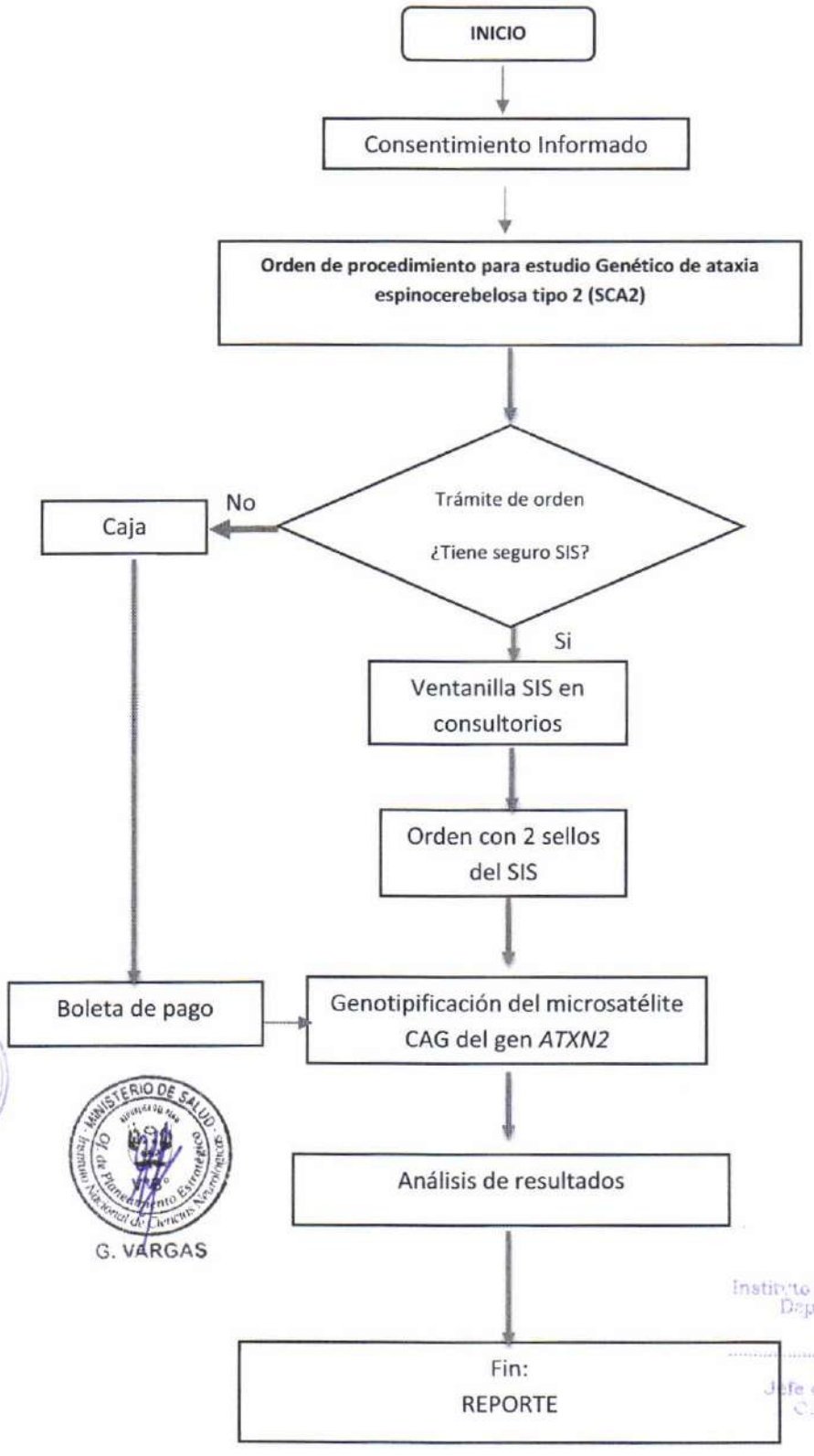
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16548 - RNE 1656

X. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 2 (SCA2)



MINISTERIO DE SALUD V°B° INST. NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS SERVICIO DE NEUROGENÉTICA
INSTITUTO NACIONAL G.N. V°B° DIRECCIÓN
MINISTERIO DE SALUD V°B° Dirección General Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
I. TAGLE L.
MINISTERIO DE SALUD V°B° Dirección General Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
P. MAZZETTI S
MINISTERIO DE SALUD V°B° Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas Dirección General
A. CARRASCO
MINISTERIO DE SALUD V°B° Of. de Planeamiento Estratégico Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
G. VARGAS
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16548 - RNE 5556

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

El ADN es la sustancia que se encuentra en nuestras células y controla tanto su funcionamiento como la herencia. En el laboratorio de Neurogenética del Centro de Investigación Básica en Neurogenética (CIBN) del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), hacemos exámenes que nos permiten encontrar cambios en el ADN, llamados mutaciones. Se requiere una muestra de sangre, de hisopado bucal u otros tejidos para obtener el ADN, según la solicitud del médico tratante. La muestra será empleada exclusivamente para estudio genético relacionado con su enfermedad. No nos es posible emplear su muestra para otros exámenes como hemoglobina, glucosa, etc. Identificar los cambios o mutaciones en el ADN puede tomar varios meses.

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

El estudio genético nos permitirá conocer el diagnóstico preciso de su enfermedad y poder darle así una atención más específica; así como también una orientación sobre su evolución, pronóstico y posible tratamiento. También le permitirá tomar decisiones de vida con la información más adecuada.

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

El resultado puede confirmar su enfermedad, descartarla o algunas veces ser incierto o poco claro; en este último caso, no podríamos precisar el diagnóstico. La entrega de resultados se realiza como parte de una consulta especial donde le daremos información sobre su enfermedad y los riesgos para Usted y su familia, es por ello que no informamos resultados por teléfono. En el tiempo que se le haya indicado que demore el procesamiento de su muestra, Ud. debe coordinar una cita para entrega de resultados y/o asesoría genética.

¿Cuáles son las molestias y riesgos para Ud. al realizar el estudio genético?

Las molestias que Ud. sentirá en la obtención de sangre será algo de dolor por el pinchazo de la aguja y rara vez podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja o bien una infección en la zona de punción. En este último caso, será atendido por personal de la institución sin costo adicional. Al conocer el resultado, esta información podría ocasionarle preocupación y temor por las consecuencias personales, familiares, laborales y sociales de llevar una enfermedad hereditaria, para lo cual se le brindará apoyo y orientación en consultas especiales de asesoría. Igualmente, si otras personas saben que uno tiene una enfermedad hereditaria, otros miembros de la familia o las personas alrededor de uno pueden discriminarnos.

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

He sido informado(a) acerca de la posibilidad de realizarme un estudio genético y he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias acerca del procedimiento; estoy satisfecho(a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1. Que se me extraiga una muestra para estudio genético de:
   Genotipificación del gen:
2. Que se me informe el resultado
3. Que se almacene mi muestra de ADN en el Banco de ADN del CIBN.

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

Yo como responsable del solicitante, doy consentimiento para el estudio genético.

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo: _____

DNI: _____

Fecha y hora: _____

Firma: _____

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Fraichin
Jefe del Dpto. de Neuro[illegible]
C.M.P. 16548 - RNE [illegible]

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

ANEXO 3

FORMATO DE REPORTE DE RESULTADO PARA PRUEBA GENÉTICA DE SCA2

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas — Neurogenética

LABORATORIO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA - INCN
RESULTADO DE ANÁLISIS MOLECULAR PARA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 2 (SCA2)

Nombres y Apellidos:	
Fecha de nacimiento	Código de la muestra:
Sexo:	Método de obtención:
Status clínico:	Remitente:
Tipo de muestra:	Fecha de obtención:
Estado de la muestra:	Fecha de emisión de resultado:

Paciente es enviado para estudio molecular por diagnóstico clínico de ataxia espinocerebelosa.

RESULTADO MOLECULAR
Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.
Presencia de un alelo con repeticiones encima del rango de normalidad.

Alelo 1: repeticiones CAG.
Alelo 2: repeticiones CAG.

INTERPRETACIÓN
El diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2) se define por el número de repeticiones CAG del alelo más largo en el gen *ATXN2*:

Alelos normales: hasta 31 repeticiones CAG.
Alelos inciertos: rango de 32 repeticiones CAG.
Alelos penetrancia incompleta: rango de 33-34 repeticiones CAG.
Alelos de penetrancia completa, patológicos: A partir de 35 o más repeticiones CAG.

La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1, los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.

PROCEDIMIENTO
Amplificación del gen *ATXN2* por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Determinación de homoalelismo por discriminación de la ausencia/presencia del alelo expandido por TP-PCR para el gen *ATXN2*. Para realizar este procedimiento se ha utilizado un método optimizado e implementado internamente [1,2].

CONCLUSIONES
- El resultado excluye/confirma el diagnóstico de Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.
- Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
- Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.

1. Figueroa-Ildefonso, E. (2018). Implementación de una metodología basada en las técnicas PCR y TP-PCR para la genotipificación del microsatélite CAG del gen ATXN2 asociado con ataxia espinocerebelosa tipo 2 en el Centro de Investigación Básica en Neurogenética.

2. Sequeiros, J., Seneca, S., & Martindale, J. (2010). Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of spinocerebellar ataxias. European Journal of Human Genetics, 18(11), 1188-1195.

Fecha de entrega de reporte a paciente:

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.pe

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Jr. Ancash Nº 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548 - RNE 7550

ANEXO 4

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA PRUEBA GENÉTICA PARA SCA2

Poliacrilamida 21%	
Acrilamida	20 g
Bisacrilamida	1 g
Enrasar a 100 mL con agua tridestilada.	

TBE 10X	
Tris base	54 mL
Ácido Bórico	27,5 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	200 uL
Enrasar a 500 mL con agua tridestilada.	

TBE 1X	
TBE 10x	100 mL
Agua tridestilada	900 mL

Poliacrilamida 6% (V=18 mL)	
Poliacrilamida 21%	5.2 mL
TBE 10x	1.8 mL
Agua tridestilada	11 mL
APS 10%	150 uL
TEMED	15 uL

Poliacrilamida 10% (V=18 mL)	
Poliacrilamida 21%	8.6 mL
TBE 10x	1.8 mL
Agua tridestilada	7.6 mL
APS 10%	150 uL
TEMED	15 uL

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Francini
Jefe del Dpto. de Neuro...
C.M.P. 16548 - RNE...

Ladder de 10pb	
Ladder de 10pb	2 uL
Agua tridestilada	8 uL

Mix de cebadores SCA2-PCR 20uM	
2A (100uM)	10 uL
2B (100uM)	10 uL
Agua ultrapura	30 uL

Mix de dNTPs 10mM (2.5mM c/u)	
Adenina – A (100 mM)	2.5 uL
Timina – T (100 mM)	2.5 uL
Guanina – G (100 mM)	2.5 uL
Citosina – C (100 mM)	2.5 uL
Agua ultrapura	90 uL

Soluciones de Tinción argéntica

Solución A: Prepare 450 mL de **solución A** agregando 30 mL de alcohol etílico de 96º y 1 mL de ácido acético y afore a 450 mL con agua tridestilada.

Solución B: Prepare 150 mL de **solución B** disolviendo 0.3g de nitrato de plata en 150 mL de agua tridestilada.

Solución C: Prepare 450 mL de **solución C** disolviendo 3g de hidróxido de sodio y 1 mL de formaldehído al 37% y afore a 450 mL con agua tridestilada.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Figueroa-Ildefonso, E. (2018). Implementación de una metodología basada en las técnicas PCR y TP-PCR para la genotipificación del microsatélite CAG del gen ATXN2 asociado con ataxia espinocerebelosa tipo 2 en el Centro de Investigación Básica en Neurogenética

2. Pulst, S. M. (1993). Spinocerebellar Ataxia Type 2. En M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. Stephens, & A. Amemiya (Eds.), GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Recuperado a partir de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1275/

3. Pulst, S. M., Nechiporuk, A., Nechiporuk, T., Gispert, S., Chen, X. N., Lopes Cendes, I., Sahba, S. (1996). Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. Nature Genetics, 14(3), 269-276. https://doi.org/10.1038/ng1196-269

4. Sequeiros, J., Martindale, J., & Seneca, S. (2010). EMQN Best Practice Guidelines for molecular genetic testing of SCAs. European Journal of Human Genetics, 18(11), 1173-1176. https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.8

5. Sequeiros, J., Seneca, S., & Martindale, J. (2010). Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of spinocerebellar ataxias. European Journal of Human Genetics, 18(11), 1188-1195. https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.10

6. Vinther-Jensen, T., Ek, J., Duno, M., Skovby, F., Hjermind, L. E., Nielsen, J. E., & Nielsen, T. T. (2013). Germ-line CAG repeat instability causes extreme CAG repeat expansion with infantile-onset spinocerebellar ataxia type 2. European Journal of Human Genetics: EJHG, 21(6), 626-629. https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.231

7. Sun Y-M, Lu C, Wu Z-Y. Spinocerebellar ataxia: relationship between phenotype and genotype - a review. Clin Genet. 2016 Oct;90(4):305-14. doi: 10.1111/cge.12808. Epub 2016 Jun 30.

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16548 - RNE 2556

5 - PRUEBA GENÉTICA PANEL DE ATAXIAS HEREDITARIAS (SCAS)

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de las ataxias hereditarias (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, DRPLA, SCA12, SCA17) a través de una guía técnica para la genotipificación del número de repeticiones CAG en los respectivos genes afectados, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de genotipificación de un panel de ataxias hereditarias dominantes (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, DRPLA, SCA12, SCA17) en apoyo al diagnóstico de las ataxias hereditarias.

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Guía técnica de aplicación obligatoria por el personal del Laboratorio de Neurogenética del Servicio y Centro de Investigación en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

CPT: 81479 - PRUEBA GENÉTICA PANEL DE ATAXIAS HEREDITARIAS (SCAS).

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- Ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1): enfermedad neurodegenerativa causada por microsatélite CAG anormalmente expandido en el gen ATXN1.
- Ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2): enfermedad neurodegenerativa causada por microsatélite CAG anormalmente expandido en el gen ATXN2.
- Ataxia espinocerebelosa tipo 3 (MJD/SCA3): enfermedad neurodegenerativa causada por microsatélite CAG anormalmente expandido en el gen ATXN3.
- Ataxia espinocerebelosa tipo 6 (SCA6): enfermedad neurodegenerativa causada por microsatélite CAG anormalmente expandido en el gen CACNA1A
- Ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7): enfermedad neurodegenerativa causada por microsatélite CAG anormalmente expandido en el gen ATXN7
- Ataxia detorubropalidoluisiana (DRPLA): enfermedad neurodegenerativa causada por microsatélite CAG anormalmente expandido en el gen ATN1
- Ataxia espinocerebelosa tipo 12 (SCA12): enfermedad neurodegenerativa causada por microsatélite CAG anormalmente expandido en el gen PPP2R2B
- Ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17): enfermedad neurodegenerativa causada por microsatélite CAG anormalmente expandido en el gen TBP
- Genotipificiación: proceso de la determinación del genotipo de una variante en el ADN de un individuo

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

- Consentimiento Informado: Procedimiento mediante el cual se garantiza que el sujeto ha expresado voluntariamente su intención de participar en una prueba genética.

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- Gen ATXN1. gen ubicado en la región autosómica 6p22.3
- Gen ATXN2. gen ubicado en la región autosómica 12q24.12
- Gen ATXN3. gen ubicado en la región autosómica 14q32.12
- Gen CACNA1A gen ubicado en la región autosómica 19p13.13
- Gen ATXN7. gen ubicado en la región autosómica 3p14.1
- Gen ATN1 gen ubicado en la región autosómica 12p13.31
- Gen PPP2R2B. gen ubicado en la región autosómica 5q31-5q32
- Gen TBP. gen ubicado en la región autosómica 6q27.
- Electroforesis capilar: Técnica utilizada para separar las diferentes moléculas presentes en una disolución de acuerdo con la relación masa/carga de las mismas.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- TP-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con cebador de triplete repetido.
- Genotipo humano: en el contexto de un estudio molecular, se refiere a los dos alelos o formas heredadas de un gen (o una variante de un gen) especifico de un individuo.
- ADN: ácido Desoxirribonucleico.

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

- 01 biólogo genetista o con entrenamiento en biología molecular.
- 01 técnico de laboratorio.
- 01 médico genetista.
- 01 médico neurólogo.

I. TAGLE L.

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

- Kit IMEGEN SCAs (REF: IMG-152), que incluye Master-Mix General-AD, Master-Mix General-EG, Taq-AD, Taq-EG, Tira Master-Mix de SCAs.
- Agua ultrapura libre de nucleasa
- GeneScan LIZ 500 dye Size Standard
- Hi-Di Formamide
- SeqStudio Genetic Analyzer Cartridge
- SeqStudio™ Cathode Buffer Container
- SeqStudio Integrated Capillary Protector

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16548 - RNE 7350

6.2.2. Material de plástico

- Micropipetas 10 µL, 20 µL, 100 µL y 200 µL.
- Tips con filtro 10 µL, 20 µL, 100 µL y 200 µL.
- Tubos de PCR de tapa plana 0.2 mL
- Tubos de PCR de tapa cónica 0.2 mL
- Microamp™ 8-Tube Strip, 0.2mL
- Microamp™ 8-Cap Strip
- Tubos de centrífuga 2 mL
- Gradilla para tubos de 0.2 mL
- Gradilla para tubos de 2 mL
- Pisetas
- MicroAmp® 96-Well Tray/Retainer Set
- Estación congelada para PCR
- Soporte para micropipetas
- Septa for 0.2 mL MicroAmp tubes
- Cathode Buffer Container Reservoir Septa for SeqStudio Genetic Analyzer

6.2.3. Otros materiales

- Papel lente para laboratorio
- Lejía
- Papel toalla
- Mascarilla descartable
- Guantes de nitrilo descartables
- Mandil descartable
- Gorro descartable
- Botas descartables
- Material de escritorio: Bolígrafo, forro de plástico, papel bond A4, Cuaderno de laboratorio, sobre manila, marcador indeleble, Tóner para impresora, archivador, sello, tintero para huella digital.

I. TAGLE L.

6.2.4. Equipos

- Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- Analizador genético SeqStudio™ (Applied Biosystems)
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- Cabina de PCR (ESCO®)
- Refrigeradores a 4ºC (Thermo Scientific)
- Refrigeradores a 4ºC (Miray)
- Congeladora a -20°C (Miray)
- Picocentrífuga
- Vórtex
- Computadoras de escritorio
- Impresora
- Sistema de alimentación eléctrica ininterrumpida
- Estabilizador

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuro...
C.M.P. 16548 - RNE ...

6.2.5. Software

- Plate manager (Applied Biosystems)
- GeneMapper™ Software 5 (Applied Biosystems)
- Gen5TM versión 2.0 (Biotek)

6.3. SERVICIOS

- Servicios de agua
- Servicio de luz
- Servicio de internet
- Aire acondicionado
- Uso del laboratorio especializado

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Este procedimiento requiere uso de un equipo de alto costo "analizador genético", imprescindible para la determinación del tamaño de repeticiones CAG de los genes mencionados. Este estudio requiere que se incluya un procedimiento TP-PCR para descartar casos de homoalelismo en el gen *ATXN2 y ATXN7.*

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
	INICIO			
1	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO	Documento de Consentimiento Informado firmado	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
2	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
3	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO *Preliquidación* Solicitar la preliquidación del procedimiento *Liquidación* Liquidar el costo del procedimiento o Trámite de aprobación del SIS	 Sello de Preliquidación Boleta de Pago Orden con dos sellos de SIS	 Oficina de Preliquidación Ventanilla CAJA Ventanilla SIS	 Contabilidad Contabilidad SIS
4	REGISTRAR LOS DATOS DEL PACIENTE	Información registrada en base de datos Solicitud de procedimiento molecular	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
5	EXTRACCIÓN DE ADN (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN	Alícuota de ADN con concentración 10 ng/uL	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
7	PROTOCOLO DE GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG PARA SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA12, SCA17 Y DRPLA Descongelar todos los reactivos del kit Imegen-SCAs. Agitar en vórtex cada reactivo y mantener en frío.	Genotipo para los alelos de microsatélites CAG	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Fraichin
Jefe del Dpto. de Neuro...
C.M. P. 16548 - RNE ...

Preparación de mix de PCR y de TP-PCR:
En un tubo de 1.5 mL, preparar el Mix A de PCR de SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA12, SCA17 y DRPLA, añadiendo 60 µL del Ataxia A Master Mix y 30 µL del General Master Mix III por cada una de las muestras o controles. Agitar en vortex y dar spin. En un tubo de 1.5 mL, preparar el Mix B de PCR y TP-PCR de SCA2 y SCA7, añadiendo 59.2 µL del Ataxia B Master Mix y 0.8 µL del General Master Mix IV por cada una de las muestras o controles. Agitar en vortex y dar spin. En una placa de 96 pocillos, dispensar 15 µL del Mix A a los pocillos correspondientes a las filas A, B, C, D, E, y F de la placa. De igual manera, dispensar 15 µL del Mix B a los pocillos correspondientes a las filas G y H para las reacciones de PCR para SCA2 y SCA7. Una vez dispensado los mixes para reacciones de PCR, dispensar 15 µL del Mix B a los pocillos en los que se desee llevar a cabo las reacciones de TP-PCR de los SCA2 y SCA7. Añadir 5 µL de los Master-Mix específicos, que contiene los cebadores de PCR de cada SCA. Añadir 5 µL de los Master Mix específicos de cada TP-PCR (TP SCA2 Master Mix y TP SCA7 Master Mix) a los pocillos correspondientes. Añadir 5 µL de muestras de ADN a 10 ng/µL a cada pocillo, o 5 µL de agua si se tratase de un control negativo o 5 µL de control positivo.
Colocar en el termociclador y ejecutar el programa siguiente: Denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de denaturación a 94°C por minuto, hibridación a 60°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 minutos, seguido por un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

NOTA: La genotipificación por TP-PCR se realiza cuando por PCR se detecta sólo un alelo dentro del rango normal.

Preparación de placa de fragmentos:
En una placa compatible con el equipo proceder con los siguientes pasos: Preparar una mezcla de 18 µL de Formamida 0.5 µL Marcador GeneScanTM 500 LIZ, por cada muestra a evaluarse. Dispensar 18.5 µL de la mezcla en cada pocillo de la placa. Añadir 1 µL del ADN obtenido en las reacciones de PCR y TP-PCR. Denaturalizar las muestras a 98°C por 5 minutos. Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador.

Electroforesis capilar
Una vez preparada la placa, las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar. Se emplearán las condiciones recomendadas por el fabricante. Para programar las condiciones de electroforesis capilar se debe tener en cuenta que el rango de amplificación varía entre 100 a 500 pb, los marcadores empleados están marcados con 6-FAM y que el patrón de peso molecular está marcado con GeneScanTM 500 LIZ.

Análisis de resultados
Resultados de PCR
Empleando el programa Genemapper, analizar el tamaño de los fragmentos generados. El resultado será un electroferograma con picos de intensidad determinada y separados de manera proporcional al tamaño del

INSTITUTO NACIONAL DE C.N. V°B° DIRECCIÓN

MINISTERIO DE SALUD V°B° SERVICIO DE NEUROGENETICA INST. NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS

MINISTERIO DE SALUD V°B° Dirección General Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

I. TAGLE L.

MINISTERIO DE SALUD V°B° Dirección General Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

P. MAZZETTI S

V°B° A. CARRASCO

MINISTERIO DE SALUD V°B° Of. de Planeamiento Estratégico Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 15848 - RNE 7536

	fragmento. Para calcular el número de repeticiones de un alelo desconocido se puede emplear la siguiente fórmula: N° de repeticiones = (Tamaño del alelo en pb - Xpb)/3 Donde X es: SCA1 = 139 SCA2 = 97 SCA3 = 160 SCA6 = 96 SCA7 = 248 SCA12 = 123 SCA17 = 127 DRPLA = 112 Resultados de TP-PCR Por TP-PCR se puede diferenciar alelos de gran tamaño que por PCR no pudieron detectarse debido a su gran tamaño. Se debe evaluar el perfil del electroferograma generado. Ver anexos			
8	REGISTRO Y REPORTE DE PROCEDIMIENTO Registrar "Reporte de laboratorio a disposición" en base de datos "Genotipificaciones".	Información registrada en base de datos y Reporte de genotipificación para SCAs	Laboratorio de Neurogenética (biólogo genetista y medico genetista)	Servicio de Neurogenética
FIN				

IX. RECOMENDACIONES

- Todo estudio genético debe ser realizado previo proceso de consentimiento informado que autorice el procedimiento genético.
- La solicitud de la prueba genética y la entrega del reporte de resultado, debe realizarse directamente con la persona afectada en el contexto de una evaluación médica y de asesoramiento genético que incluye evaluación pre-test, test y post-test.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

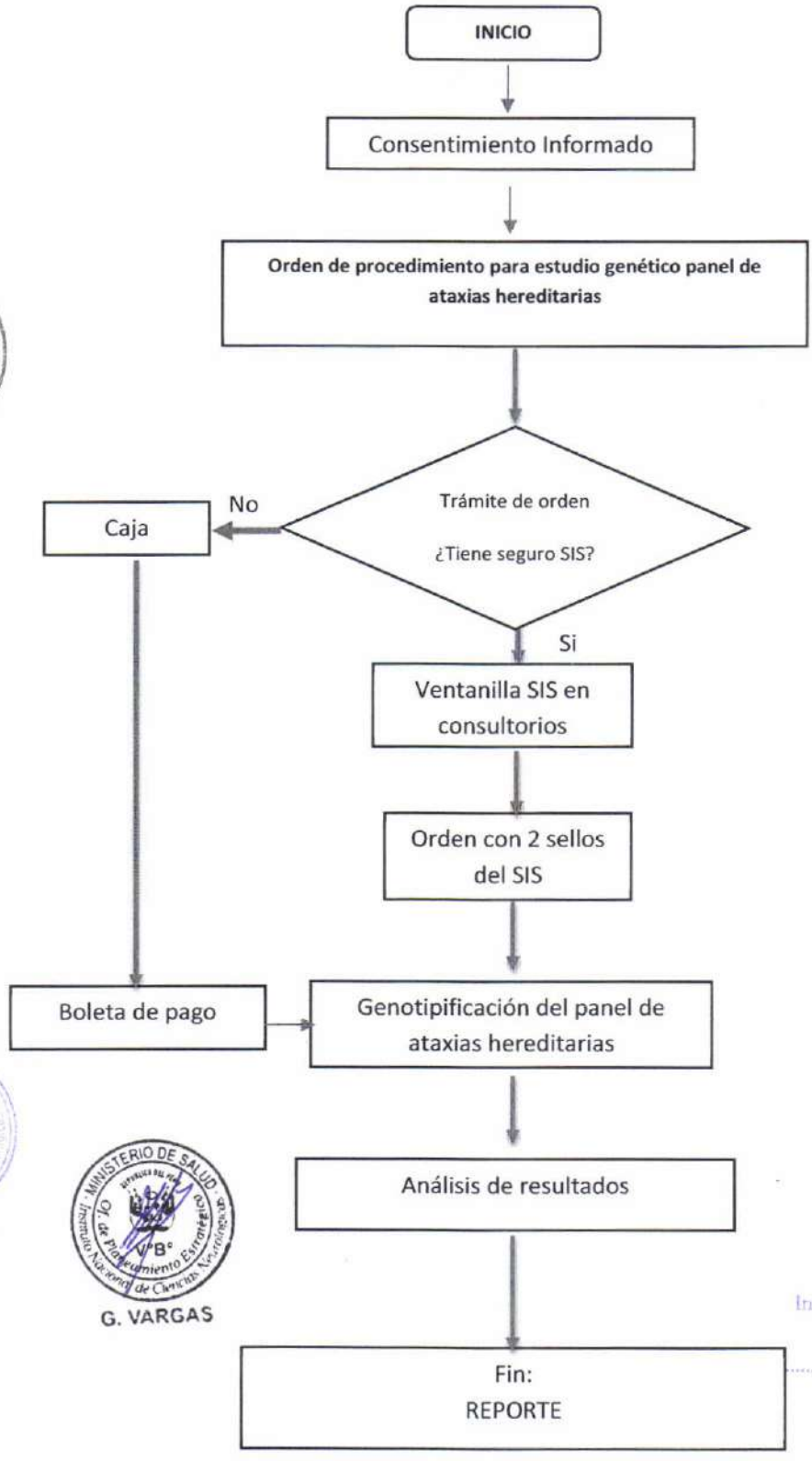
P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Kivas Frankin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 15548 - RNE 7536

X. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PANEL DE ATAXIAS HEREDITARIAS



I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16548 - RNE 7956

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

El ADN es la sustancia que se encuentra en nuestras células y controla tanto su funcionamiento como la herencia. En el laboratorio de Neurogenética del Centro de Investigación Básica en Neurogenética (CIBN) del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), hacemos exámenes que nos permiten encontrar cambios en el ADN, llamados mutaciones. Se requiere una muestra de sangre, de hisopado bucal u otros tejidos para obtener el ADN, según la solicitud del médico tratante. La muestra será empleada exclusivamente para estudio genético relacionado con su enfermedad. No nos es posible emplear su muestra para otros exámenes como hemoglobina, glucosa, etc. Identificar los cambios o mutaciones en el ADN puede tomar varios meses.

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

El estudio genético nos permitirá conocer el diagnóstico preciso de su enfermedad y poder darle así una atención más específica; así como también una orientación sobre su evolución, pronóstico y posible tratamiento. También le permitirá tomar decisiones de vida con la información más adecuada.

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

El resultado puede confirmar su enfermedad, descartarla o algunas veces ser incierto o poco claro; en este último caso, no podríamos precisar el diagnóstico. La entrega de resultados se realiza como parte de una consulta especial donde le daremos información sobre su enfermedad y los riesgos para Usted y su familia, es por ello que no informamos resultados por teléfono. En el tiempo que se le haya indicado que demore el procesamiento de su muestra, Ud. debe coordinar una cita para entrega de resultados y/o asesoría genética.

¿Cuáles son las molestias y riesgos para Ud. al realizar el estudio genético?

Las molestias que Ud. sentirá en la obtención de sangre será algo de dolor por el pinchazo de la aguja y rara vez podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja o bien una infección en la zona de punción. En este último caso, será atendido por personal de la institución sin costo adicional. Al conocer el resultado, esta información podría ocasionarle preocupación y temor por las consecuencias personales, familiares, laborales y sociales de llevar una enfermedad hereditaria, para lo cual se le brindará apoyo y orientación en consultas especiales de asesoría. Igualmente, si otras personas saben que uno tiene una enfermedad hereditaria, otros miembros de la familia o las personas alrededor de uno pueden discriminarnos.

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

He sido informado(a) acerca de la posibilidad de realizarme un estudio genético y he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias acerca del procedimiento; estoy satisfecho(a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1. Que se me extraiga una muestra para estudio genético de:
   Genotipificación del gen:
2. Que se me informe el resultado
3. Que se almacene mi muestra de ADN en el Banco de ADN del CIBN.

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

I. TAGLE L.

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

Yo como responsable del solicitante, doy consentimiento para el estudio genético.

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

A. CARRASCO

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo: _____

DNI: _____

Fecha y hora: _____

Firma: _____

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

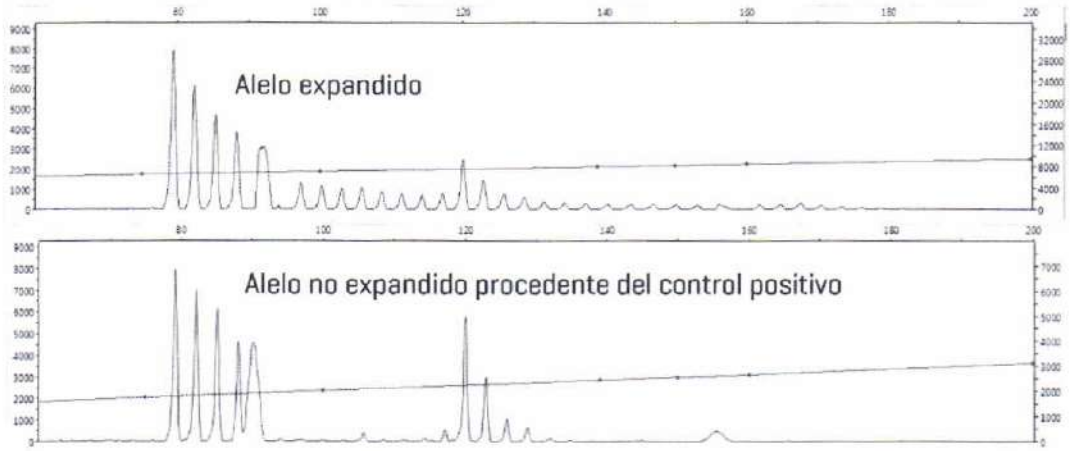
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuro[illegible]
C.M.P. 16548 - RNE [illegible]

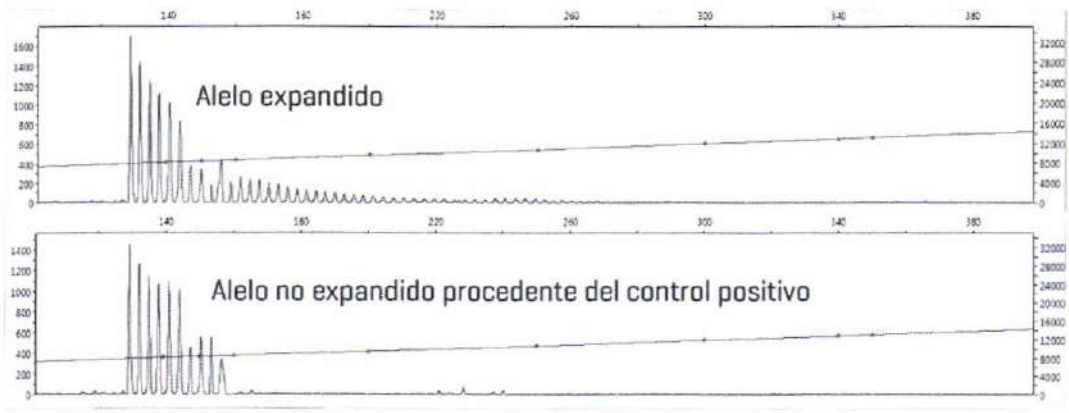
ANEXO 3

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE ELECTROFEROGRAMA DE TP-PCR

TP-PCR PARA SCA2



TP-PCR PARA SCA7



I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

A. CARRASCO

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Francisco
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548 - RNE

ANEXO 4

FORMATO DE REPORTE DE RESULTADO PARA PRUEBA GENÉTICA DE PANEL DE ATAXIAS HEREDITARIAS

PERÚ Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas — Neurogenética

LABORATORIO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA- INCN
PANEL DE ATAXIAS HEREDITARIAS

Nombres y Apellidos:			
Fecha de nacimiento		Código de la muestra:	
Sexo:		Método de obtención:	
Status clínico:		Remitente:	
Tipo de muestra:		Fecha de obtención:	
Estado de la muestra:		Fecha de emisión de resultado:	

Paciente es enviado para estudio molecular por diagnóstico clínico de ataxia espinocerebelosa.

RESULTADO DE ANALISIS MOLECULAR PARA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 1 (SCA1)

RESULTADO MOLECULAR
Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.
Presencia de un alelo con repeticiones encima del rango de normalidad.

Alelo 1: repeticiones CAG.
Alelo 2: repeticiones CAG.

INTERPRETACIÓN
El diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1) se define por el número de repeticiones CAG del alelo más largo:

Alelos normales: hasta 38 repeticiones CAG. Asimismo, alelos con 39 a 44 repeticiones con presencia de interrupciones CAT.

Alelos con penetrancia completa, patológico: A partir de 39 a 44 repeticiones CAG sin interrupciones CAT o alelos con 45 a más repeticiones CAG sin interrupciones.

PROCEDIMIENTO:
El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *ATXN1* consiste en la amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Utilizando el kit Imegen®SCAs.
La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1, los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.

CONCLUSIONES
- El resultado excluye/confirma el diagnóstico de Ataxia Espinocerebelosa tipo 1.
- Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
- Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.

RESULTADO DE ANALISIS MOLECULAR PARA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 2 (SCA2)

RESULTADO MOLECULAR
Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.
Presencia de un alelo con repeticiones encima del rango de normalidad.

Alelo 1: repeticiones CAG.
Alelo 2: repeticiones CAG.

INTERPRETACIÓN
El diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2) se define por el número de repeticiones CAG del alelo más largo en el gen *ATXN2*:

Alelos normales: hasta 31 repeticiones CAG.

Alelos inciertos: rango de 32 a 34 repeticiones CAG.

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.pe

Jr. Ancash Nº 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

I. TAGLE L.
P. MAZZETTI S
A. CARRASCO
G. VARGAS

PERÚ Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Neurogenética

Alelos de penetrancia completa, patológicos: A partir de 35 o más repeticiones CAG.

PROCEDIMIENTO:
El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *ATXN2* consiste en amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Utilizando el kit Imegen®SCAs.
La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1, los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.

CONCLUSIONES
- El resultado excluye/confirma el diagnóstico de Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.
- Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
- Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.

RESULTADO DE ANALISIS MOLECULAR PARA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 3 (SCA3)

RESULTADO MOLECULAR
Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.
Presencia de un alelo con repeticiones encima del rango de normalidad.

Alelo 1: repeticiones CAG.
Alelo 2: repeticiones CAG.

INTERPRETACIÓN

El diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3) se define por el número de repeticiones CAG del alelo más largo en el gen *ATXN3*:
Alelos normales: hasta 44 repeticiones CAG.
Alelos penetrancia intermedia: rango de 45 a 59 repeticiones CAG.
Alelos de penetrancia completa, patológico: A partir de 60 o más repeticiones CAG.

PROCEDIMIENTO
El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *ATXN3* consiste en amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Utilizando el kit Imegen®SCAs.
La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1, los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.

CONCLUSIONES:
- El resultado excluye/confirma el diagnóstico de Ataxia Espinocerebelosa tipo 3.
- Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
- Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.

RESULTADO DE ANALISIS MOLECULAR PARA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 6 (SCA6)

RESULTADO MOLECULAR
Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.
Presencia de un alelo con repeticiones encima del rango de normalidad.

Alelo 1: repeticiones CAG.
Alelo 2: repeticiones CAG.

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.pe

Jr. Ancash Nº 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S.

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16848 - RNE 7656

INTERPRETACIÓN

El diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 6 (SCA6) se define por el número de repeticiones CAG del alelo más largo en el gen *CACNA1A*:

Alelos normales: hasta 18 repeticiones CAG.
Alelos penetrancia intermedia: 19 repeticiones CAG.
Alelos de penetrancia completa: A partir de 20 o más repeticiones CAG.

PROCEDIMIENTO

El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *CACNA1A* consiste en amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Utilizando el kit Imegen®SCAs.

La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1, los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.

CONCLUSIONES:

- El resultado excluye/confirma el diagnóstico de Ataxia Espinocerebelosa tipo 6.
- Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
- Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.

RESULTADO DE ANALISIS MOLECULAR PARA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 7 (SCA7)

RESULTADO MOLECULAR

Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.
Presencia de un alelo con repeticiones encima del rango de normalidad.

Alelo 1: repeticiones CAG.
Alelo 2: repeticiones CAG.

INTERPRETACIÓN

El diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) se define por el número de repeticiones CAG del alelo más largo en el gen *ATXN7*:

Alelos normales: hasta 19 repeticiones CAG.
Alelos inciertos: rango de 28 a 33 repeticiones CAG.
Alelos de penetrancia intermedia: rango de 34 a 35 repeticiones CAG.
Alelos de penetrancia completa: A partir de 36 a más repeticiones CAG.

PROCEDIMIENTO

El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *ATXN7* consiste en amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Determinación de homoalelismo por discriminación de la ausencia/presencia del alelo expandido por TP-PCR para el gen *ATXN7*. Utilizando el kit Imegen®SCAs.

La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1, los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.

CONCLUSIONES:

- El resultado excluye/confirma el diagnóstico de Ataxia Espinocerebelosa tipo 7.
- Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
- Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.pe

Jr. Ancash Nº 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Neurogenética

RESULTADO DE ANALISIS MOLECULAR PARA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 12 (SCA12)

RESULTADO MOLECULAR
Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.
Presencia de un alelo con repeticiones encima del rango de normalidad.

Alelo 1: repeticiones CAG.
Alelo 2: repeticiones CAG.

INTERPRETACIÓN
El diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 12 (SCA12) se define por el número de repeticiones CAG del alelo más largo en el gen *PPP2R2B*.
Alelos normales: hasta 32 repeticiones CAG.
Alelos incierto: rango de 40 a 45 repeticiones CAG.
Alelos de penetrancia completa: A partir de 51 o más repeticiones CAG.

PROCEDIMIENTO
El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *PPP2R2B* consiste en amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Utilizando el kit Imegen®SCAs.
La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1, los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.

CONCLUSIONES:
- El resultado excluye/confirma el diagnóstico de Ataxia Espinocerebelosa tipo 12.
- Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
- Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.

RESULTADO DE ANALISIS MOLECULAR PARA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 17 (SCA17)

RESULTADO MOLECULAR
Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.
Presencia de un alelo con repeticiones encima del rango de normalidad.

Alelo 1: repeticiones CAG.
Alelo 2: repeticiones CAG.

INTERPRETACIÓN
El diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17) se define por el número de repeticiones CAG del alelo más largo en el gen *TBP*.
Alelos normales: hasta 40 repeticiones CAG.
Alelos de penetrancia intermedia: rango de 41 a 48 repeticiones CAG.
Alelos de penetrancia completa: A partir de 49 o más repeticiones CAG.

PROCEDIMIENTO
El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *TBP* consiste en amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Utilizando el kit Imegen®SCAs.
La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1, los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.

CONCLUSIONES:
- El resultado excluye/confirma el diagnóstico de Ataxia Espinocerebelosa tipo 17.

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.pe

Jr. Ancash Nº 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Dante Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuro[illegible]
C.M. Nº 16548 - RNE [illegible]

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Neurogenética

- Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
- Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.

RESULTADO DE ANALISIS MOLECULAR PARA ATROFIA DENTATO-RUBRO-PÁLIDO-LUISIANA (DRPLA)

RESULTADO MOLECULAR

Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.
Presencia de un alelo con repeticiones encima del rango de normalidad.

Alelo 1: repeticiones CAG.
Alelo 2: repeticiones CAG.

INTERPRETACIÓN

El diagnóstico molecular de Atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA) se define por el número de repeticiones CAG del alelo más largo en el gen *ATN1*:

Alelos normales: hasta 35 repeticiones CAG.
Alelos inciertos: rango de 36 a 47 repeticiones CAG.
Alelos de penetrancia completa: A partir de 48 o más repeticiones CAG.

PROCEDIMIENTO

El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *ATN1* consiste en amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Utilizando el kit Imegen®SCAs.
La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1, los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.

CONCLUSIONES:

- El resultado excluye/confirma el diagnóstico de Atrofia Dentato-Rubro-Pálido-Luisiana.
- Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
- Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.pe

Jr. Ancash Nº 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548 - RNE 7536

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. SCA Base. Reference ranges for oligonucleotide repeat sizes at main SCA loci. http://www.scabase.eu/table3.php

2. Toyoshima Y, Onodera O, Yamada M, et al. Spinocerebellar Ataxia Type 17. 2005 Mar 29 [Updated 2012 May 17]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019.Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1438/

3. Veneziano L, Frontali M. DRPLA. 1999 Aug 6 [Updated 2016 Jun 9]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019.Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1491/

4. Sun Y-M, Lu C, Wu Z-Y. Spinocerebellar ataxia: relationship between phenotype and genotype - a review. Clin Genet. 2016 Oct;90(4):305-14. doi: 10.1111/cge.12808. Epub 2016 Jun 30.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548 - RNE 2656

6 - PRUEBA GENÉTICA PARA DISTONÍA TIPO DYT1

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de la Distonía tipo DYT1, a través de una guía técnica para la genotipificación del gen *TORSINA1A*, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Establecer el procedimiento de la prueba genética para la mutación 904-906delGAG/907-909delGAG del gen *TORSINA1A*, prueba diagnóstica para la Distonía DYT1

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Guía técnica de aplicación obligatoria por el personal del Laboratorio de Neurogenética del Servicio y Centro de Investigación en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

CPT: 81418 - PRUEBA GENÉTICA PARA DISTONÍA TIPO DYT1

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- RFLP: Polimorfismos de los fragmentos de restricción
- Distonía primaria DYT1: enfermedad neurodegenerativa causada por una deleción de nucleótidos GAG en la posición 904-906 del gen TORSIN1A.
- Gen TORSIN1A gen ubicado en la región autosómica 9q34.11.

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, procedimiento mediante el cual se amplifica (obtienen muchas copias) de ADN
- Nucleótido: es una molécula que es la unidad estructural básica y el bloque de construcción del ADN y/o ARN, una de sus partes es una base nitrogenada las cuales pueden ser adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) o uracilo (U).
- Genotipo humano: en el contexto de un estudio molecular, se refiere a los dos alelos o formas heredadas de un gen (o una variante de un gen) específico de un individuo.
- ADN: ácido Desoxirribonucleico, contiene la información de las características hereditarias y las secuencias para la creación de aminoácidos que generarán proteínas para el funcionamiento de un organismo.
- Consentimiento Informado: Procedimiento mediante el cual se garantiza que el sujeto ha expresado voluntariamente su intención de participar en una prueba genética.

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

- 01 biólogo genetista o con entrenamiento en biología molecular.
- 01 técnico de laboratorio.
- 01 médico neurólogo.

- 01 médico genetista.

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

- dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- Agua ultrapura libre de nucleasa
- DYT1-F: 5'-CAGTCCCGAGGCTATGAAATTG-3
- DYT1-R: 5'-ATGGAAGGACTGAGTGTTG-3'
- Platinum® Taq DNA polymerase 5 U/µL (Invitrogen). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl2 50 mM.
- Marcador de peso molecular de 10 pb (Invitrogen)
- Enzima de restricción BseRI (10U/uL)

6.2.2. Reactivos químicos

- Acrilamida
- Bisacrilamida
- Nitrato de Plata
- TEMED
- Persulfato de amonio
- Tris base
- Ácido bórico
- EDTA 0.5M pH 8
- Ácido Clorhídrico
- Xilencianol
- Azul de Bromofenol
- Glicerol
- Etanol absoluto
- Ácido acético
- Hidróxido de sodio
- Formaldehído 37%

I. TAGLE L.

6.2.3. Material de plástico

- Micropipetas 10 µL, 20 µL, 100 µL
- Tips con filtro 10 µL, 20 µL, 100 µL,
- Tubos de PCR 0.2 mL
- Gradillas para tubos de 0.2 mL
- Pisetas
- Estación congelada para PCR
- Placa de siembra
- Soporte para micropipetas

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

6.2.4. Material de vidrio

- Matraz aforado de 1000 mL
- Probetas de 250 mL y 1000 mL
- Vasos de precipitado de 50mL

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Francisco
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 15548 - RNE 1556

- Pipetas de 2mL y 10 mL.
- Propipetas
- Frascos para soluciones

6.2.5. Otros materiales

- Papel lente para laboratorio
- Papel aluminio
- Lejía
- Papel toalla
- Parafilm
- Mascarilla descartable
- Guantes de nitrilo descartables
- Mandil descartable
- Gorro descartable
- Botas descartables
- Material de escritorio: Bolígrafo, forro de plástico, papel bond A4, Cuaderno de laboratorio, sobre manila, marcador indeleble, Tóner para impresora.

6.2.6. Equipos

- Termociclador SimpleAmp
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- Cabina de PCR (ESCO®)
- Cámara de electroforesis vertical profesional (Cleaver)
- Incubadora
- Fotodocumentador
- Fuente poder (Biorad)
- Balanza analítica (Shimadzu)
- Agitador magnético (Velp)
- Congeladora a -8°C/-20oC (Frigidaire)
- Picocentrífuga
- Vórtex
- Cronómetro
- Computadoras de escritorio
- Impresora
- Sistema de alimentación eléctrica ininterrumpida
- Estabilizador

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S.

A. CARRASCO

6.2.7. Software

- Plate manager (Applied Biosystems)
- GeneMapper™ Software 5 (Applied Biosystems)
- Gen5TM versión 2.0 (Biotek)

6.3. SERVICIOS

- Servicios de agua
- Servicio de luz

G. VARGAS

- Servicio de internet
- Aire acondicionado
- Uso del laboratorio especializado

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Ninguna.

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
	INICIO			
1	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO	Documento de Consentimiento Informado firmado	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
2	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
3	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO *Preliquidación* Solicitar la preliquidación del procedimiento *Liquidación* Liquidar el costo del procedimiento o Trámite de aprobación del SIS	 Sello de Preliquidación Boleta de Pago Orden con dos sellos de SIS	 Oficina de Preliquidación Ventanilla CAJA Ventanilla SIS	 Contabilidad Contabilidad SIS
4	REGISTRAR LOS DATOS DEL PACIENTE	Información registrada en base de datos Solicitud de procedimiento molecular	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
5	EXTRACCIÓN DE ADN (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN	Alícuota de ADN con concentración 10 ng/uL	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
7	GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN TOR1A POR PCR-RFLP *Amplificación por PCR* Preparar la siguiente mezcla de reacción para 1 muestra. Volumen de reacción: 10 uL agregar: 1 uL de Buffer de PCR para enzima taq platinum 10X,0,5 uL de mix dNTPs 2,5mM, 0,5 uL de $MgCl_2$ 50mM, 0,2uL de Cebador DYT1- 10uM, 0,2uL de Cebador DYT2-10uM, 0,1 uL Enzima taq platinum 5U/uL, 1 uL de ADN 10 ng/uL Emplear el siguiente programa de amplificación: 2 minutos de denaturación inicial a 94°C, 29 ciclos de denaturación a 94°C por 30 seg., hibridación a 60°C por 30 seg. y extensión a 72°C por 30 seg.; seguido por un paso de extensión final a 72°C por 10 min. *Corte con Enzima BseRI* Buffer10X 1uL, Enzima BseRI 5U/uL, 0,16 uL, Agua ddd 2,84 uL Incubar a 37°C x 2 horas	Genotipo para los alelos del gen DYT1	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Kuan Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16564 - RNE 7556

	Visualización de productos de amplificación: Preparar un gel de poliacrilamida al 8% no denaturante para la electroforesis de los productos de PCR. Sembrar en cada pocillo 2uL de producto de PCR con 2uL de buffer de siembra. Además, se debe colocar un 0.7 uL marcador de peso molecular de 10pb con 2uL de buffer de siembra. Administrar un voltaje de 150 V por 1 hora. Realizar la tinción del gel con el protocolo de tinción argéntica. *Análisis del alelo polimórfico* Presencia de un fragmento con una deleción de 3 pares de base, lo que se evidencia con la presencia de al menos 3 bandas en el rango de 50 a pb-150pb.			
8	REGISTRO Y REPORTE DE PROCEDIMIENTO Registrar "Reporte de laboratorio a disposición" en base de datos "Genotipificaciones".	Información registrada en base de datos y Reporte de genotipificación para DYT1	Laboratorio de Neurogenética (biólogo genetista y medico genetista)	Servicio de Neurogenética
	FIN			

IX. RECOMENDACIONES

- Todo estudio genético debe ser realizado previo proceso de consentimiento informado que autorice el procedimiento genético.
- La solicitud de la prueba genética y la entrega del reporte de resultado, debe realizarse directamente con la persona afectada en el contexto de una evaluación médica y de asesoramiento genético que incluye evaluación pre-test, test y post-test.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

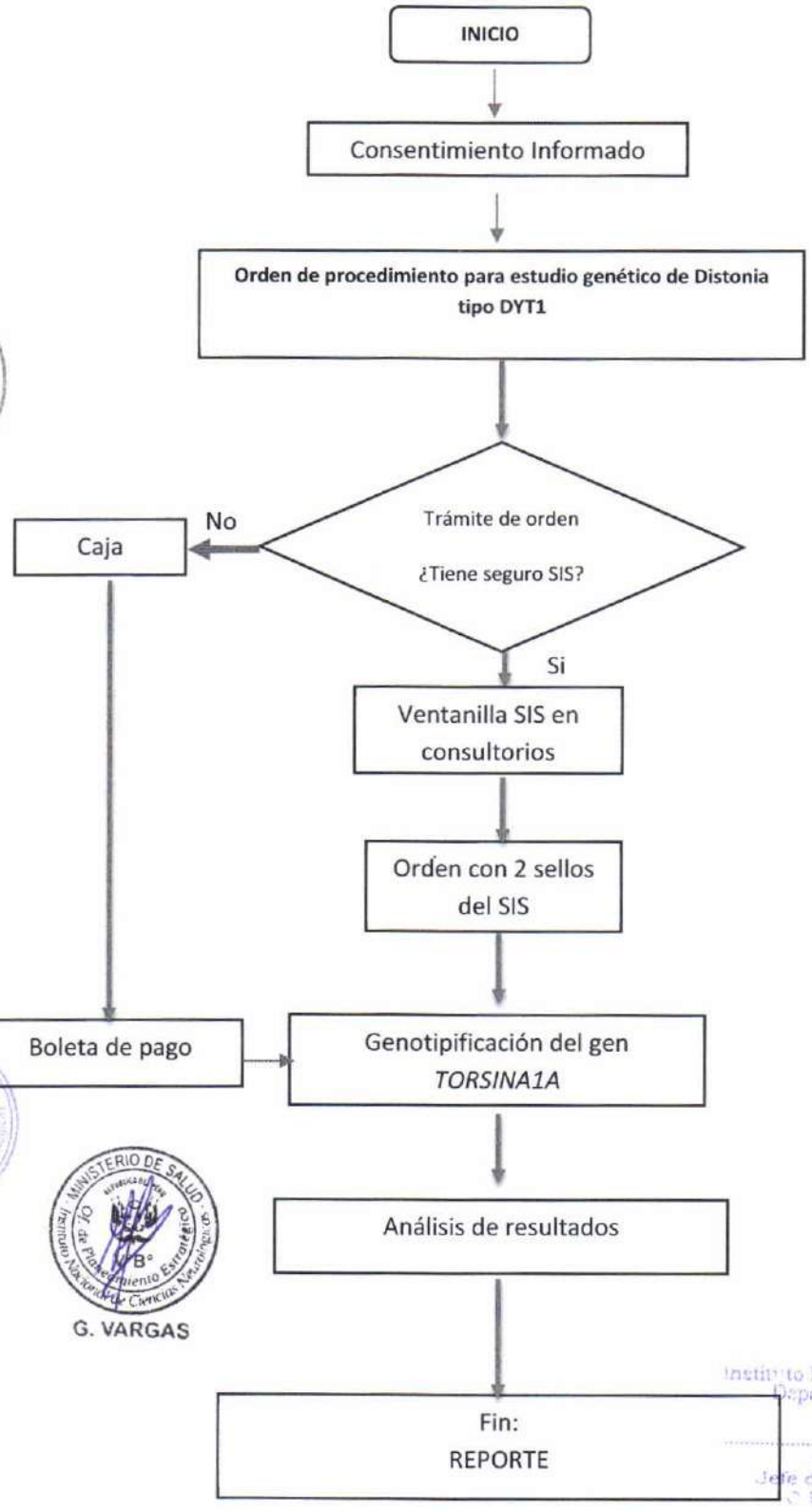
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548 - [illegible]

X. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA DISTONIA DYT1



I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuro...
C.M.P. 16548 - RNE 7656

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

El ADN es la sustancia que se encuentra en nuestras células y controla tanto su funcionamiento como la herencia. En el laboratorio de Neurogenética del Centro de Investigación Básica en Neurogenética (CIBN) del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), hacemos exámenes que nos permiten encontrar cambios en el ADN, llamados mutaciones. Se requiere una muestra de sangre, de hisopado bucal u otros tejidos para obtener el ADN, según la solicitud del médico tratante. La muestra será empleada exclusivamente para estudio genético relacionado con su enfermedad. No nos es posible emplear su muestra para otros exámenes como hemoglobina, glucosa, etc. Identificar los cambios o mutaciones en el ADN puede tomar varios meses.

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

El estudio genético nos permitirá conocer el diagnóstico preciso de su enfermedad y poder darle así una atención más específica; así como también una orientación sobre su evolución, pronóstico y posible tratamiento. También le permitirá tomar decisiones de vida con la información más adecuada.

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

El resultado puede confirmar su enfermedad, descartarla o algunas veces ser incierto o poco claro; en este último caso, no podríamos precisar el diagnóstico. La entrega de resultados se realiza como parte de una consulta especial donde le daremos información sobre su enfermedad y los riesgos para Usted y su familia, es por ello que no informamos resultados por teléfono. En el tiempo que se le haya indicado que demore el procesamiento de su muestra, Ud. debe coordinar una cita para entrega de resultados y/o asesoría genética.

¿Cuáles son las molestias y riesgos para Ud. al realizar el estudio genético?

Las molestias que Ud. sentirá en la obtención de sangre será algo de dolor por el pinchazo de la aguja y rara vez podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja o bien una infección en la zona de punción. En este último caso, será atendido por personal de la institución sin costo adicional. Al conocer el resultado, esta información podría ocasionarle preocupación y temor por las consecuencias personales, familiares, laborales y sociales de llevar una enfermedad hereditaria, para lo cual se le brindará apoyo y orientación en consultas especiales de asesoría. Igualmente, si otras personas saben que uno tiene una enfermedad hereditaria, otros miembros de la familia o las personas alrededor de uno pueden discriminarnos.

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

He sido informado(a) acerca de la posibilidad de realizarme un estudio genético y he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias acerca del procedimiento; estoy satisfecho(a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1. Que se me extraiga una muestra para estudio genético de:
   Genotipificación del gen:
2. Que se me informe el resultado
3. Que se almacene mi muestra de ADN en el Banco de ADN del CIBN.

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

Yo como responsable del solicitante, doy consentimiento para el estudio genético.

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo: _____

DNI: _____

Fecha y hora: _____

Firma: _____

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16548 - RNE 7156

ANEXO 3

FORMATO DE REPORTE DE RESULTADO PARA PRUEBA GENÉTICA DE DISTONIA TIPO DYT1

PERÚ Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Neurogenética

LABORATORIO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA
PRUEBA GENÉTICA PARA DISTONIA PRIMARIA DYT1 N° -DYT1-

Nombres y Apellidos:	
Fecha de nacimiento	Código de la muestra:
Sexo:	Método de obtención:
Status clínico:	Remitente:
Tipo de muestra:	Fecha de obtención:
Estado de la muestra:	Fecha de emisión de resultado:

Paciente es enviado para estudio molecular por diagnóstico clínico de distonia tipo DYT1.

RESULTADO MOLECULAR

NO/DETECTA la variante patogénica "904_906delGAG/907_ 909delGAG" en el gen *TOR1A,* debido a que se evidencia fragmentos en el rango de 50pb a 150pb

INTERPRETACIÓN
La presencia de la variante patogénica "904_906delGAG/907_ 909delGAG" en al menos uno de los alelos está asociada a la Distonía Primaria DYT1 hasta en el 30% de los portadores de esta mutación y por la técnica utilizada la interpretación es la siguiente:

Genotipo normal: se evidencia dos fragmentos en el rango de 50pb a 150pb.
Genotipo con la variante patogénica "904_906delGAG/907_ 909delGAG": se evidencia la presencia de ≥3 fragmentos en el rango de 50pb a 150pb.

PROCEDIMIENTO
El estudio molecular para genotipificación de la variante patogénica "904_906delGAG/907_ 909delGAG" en gen *TOR1A* consiste en amplificación por PCR en tiempo final, seguido de análisis de fragmentos de longitud polimórfica (RFLP) en gel de poliacrilamida e interpretación del número de fragmentos.

CONCLUSIONES

- El resultado excluye/confirma el diagnóstico de Distonía Primaria DYT1.
- Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
- Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.

Fecha de entrega de reporte a paciente:

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.pe

Jr. Ancash Nº 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

ANEXO 4

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA PRUEBA GENÉTICA DE DISTONIA TIPO DYT1

Poliacrilamida 21%	
Acrilamida	20 g
Bisacrilamida	1 g
Enrasar a 100 mL con agua tridestilada.	

TBE 10X	
Tris base	54 mL
Ácido Bórico	27,5 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	200 uL
Enrasar a 500 mL con agua tridestilada.	

TBE 1X	
TBE 10x	100 mL
Agua tridestilada	900 mL

Poliacrilamida 8% (V=18 mL)	
Poliacrilamida 21%	6.9 mL
TBE 10x	1.8 mL
Agua tridestilada	9.3 mL
APS 10%	150 uL
TEMED	15 uL

I. TAGLE L.

Ladder de 10pb	
Ladder de 10pb	2 uL
Agua tridestilada	8 uL

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

Mix de dNTPs 10mM (2.5mM c/u)	
Adenina – A (100 mM)	2.5 uL
Timina – T (100 mM)	2.5 uL
Guanina – G (100 mM)	2.5 uL
Citosina – C (100 mM)	2.5 uL

G. VARGAS

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuro[illegible]
C.M.P. 16548 - RNE[illegible]

Agua ultrapura	90 uL

Soluciones de Tinción argéntica

Solución A: Prepare 450 mL de **solución A** agregando 30 mL de alcohol etílico de 96º y 1 mL de ácido acético y afore a 450 mL con agua tridestilada.

Solución B: Prepare 150 mL de **solución B** disolviendo 0.3g de nitrato de plata en 150 mL de agua tridestilada.

Solución C: Prepare 450 mL de **solución C** disolviendo 3g de hidróxido de sodio y 1 mL de formaldehído al 37% y afore a 450 mL con agua tridestilada.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548 - ENE 1950

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Albanese, A., et. al. (2011). EFNS guidelines on diagnosis and treatment of primary dystonias. European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies, 18(1), 5-18.

2. Fahn, S. (2011). Classification of movement disorders. Movement Disorders, 26(6), 947–957.

3. Ozelius, L. J., et. al. (1997). The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. Nat Genet, 17(1), 40-48.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Feuchtin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 15548 - RNE [illegible]

7 - PRUEBA GENÉTICA PARA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE POR MLPA

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de las Distrofinopatias (Distrofia Muscular de Duchenne, Distrofia muscular de Becker y la Cardiomiopatía dilatada), a través de una guía técnica para para estudio del gen *DMD* por técnica de MLPA, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de análisis de la variación del número de copias del gen *DMD* a través de la técnica de *Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA)*.

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Guía técnica de aplicación obligatoria por el personal del laboratorio de Neurogenética del Servicio y Centro de Investigación en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO

CPT: 81479 - PRUEBA GENÉTICA PARA ESTUDIO DE GEN *DMD* POR TÉCNICA DE MLPA

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- Consentimiento Informado: Procedimiento mediante el cual se garantiza que el sujeto ha expresado voluntariamente su intención de participar en una prueba genética

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- MLPA: método basado en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cuantificación relativa del número de copias normales y anormales del ADN. Tiene aplicación tanto en investigación como en diagnóstico.
- Distrofinopatias: cubren un espectro de enfermedades musculares ligadas al X que van desde leves a severas y que incluyen la distrofia muscular de Duchenne, la distrofia muscular de Becker y la cardiomiopatía dilatada asociada a DMD.
- Distrofia muscular de Duchenne (DMD) es un trastorno ligado al cromosoma X que afecta aproximadamente a 1 de cada 6000 nacidos vivo y tiene una prevalencia basada de 3.52-12.57 por 100.000. Se caracteriza por debilidad muscular rápidamente progresiva, cuya edad media de diagnóstico es a los 4 años, comienzan a usar silla de ruedas aproximadamente a los 12 años, y fallecen alrededor de los 20 años de edad por insuficiencia respiratoria o cardíaca.
- Distrofia muscular de Becker (BMD) se caracteriza por una debilidad muscular esquelética de inicio tardío. A pesar de la afectación del músculo esquelético más leve, la insuficiencia cardíaca por Cardiomiopatía dilatada es una causa común de morbilidad y la causa más común de muerte en la DMB. La edad media de la muerte es a mediados de los años 40.

- Cardiomiopatía dilatada asociada a DMD (DCM) se caracteriza por dilatación del ventrículo izquierdo e insuficiencia cardíaca congestiva. Las mujeres heterocigotas para una variante patógena de DMD tienen un mayor riesgo de DCM.
- Gen DMD. gen ubicado en la región de cromosoma X, Xp21.2. Variantes patogénicas en este gen están asociadas a Distrofia Muscular de Duchenne, Distrofia muscular de Becker y la Cardiomiopatía dilatada
- Electroforesis capilar: Técnica utilizada para separar las diferentes moléculas presentes en una disolución de acuerdo con la relación masa/carga de las mismas.
- Nucleótido: es una molécula que es la unidad estructural básica y el bloque de construcción del ADN y/o ARN, una de sus partes es una base nitrogenada las cuales pueden ser adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) o uracilo (U).
- Genotipo humano: en el contexto de un estudio molecular, se refiere a los dos alelos o formas heredadas de un gen (o una variante de un gen) especifico de un individuo.
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico, contiene la información de las características hereditarias y las secuencias para la creación de aminoácidos que generarán proteínas para el funcionamiento de un organismo.

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

- 01 biólogo genetista o con entrenamiento en biología molecular
- 01 técnico de laboratorio
- 01 médico genetista

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

- SALSA MLPA P034 DMD mix 1 probemix (MRC Holland)
- SALSA MLPA P035 DMD mix 2 probemix (MRC Holland)
- SALSA MLPA EK1 reagent kit (MRC Holland)
- Agua ultrapura libre de nucleasa
- GeneScan LIZ 500 dye Size Standard
- Hi-Di Formamide
- SeqStudio Genetic Analyzer Cartridge
- SeqStudio™ Cathode Buffer Container
- SeqStudio Integrated Capillary Protector

6.2.2. Reactivos químicos

- Agarosa
- Tris
- Ácido Bórico
- EDTA 0.5M pH 8.0
- Safe-Green™ (ABM)
- Agua tridestilada

6.2.3. Material de plástico

- Tips con filtro 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL
- Tubos de PCR 0.2 Ml

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 19548 - RNE 7556

- MicroampTM 8-Tube Strip, 0.2mL
- MicroampTM 8-Cap Strip
- Tubos de centrífuga 2 mL
- Gradillas para tubos de 0.2 mL
- Gradillas para tubos de 2 mL
- Pisetas
- Cathode Buffer Container Reservoir Septa for SeqStudio Genetic Analyzer
- MicroAmp® 96-Well Tray/Retainer Set
- Estación congelada para PCR
- Placa de cultivo de 96 pocillos
- Soporte para micropipetas
- Septa for 0.2 mL MicroAmp tubes
- Cathode Buffer Container Reservoir Septa for SeqStudio Genetic Analyzer

6.2.4. Material de vidrio

- Matraz aforado de 500 mL
- Probeta de 1000 mL
- Erlenmeyer 250mL
- Vasos de precipitados de 50 mL
- Pipeta de vidrio 10 mL
- Pipeta de vidrio de 5 mL.
- Propipetas
- Baguetas

I. TAGLE L.

6.2.5. Otros materiales

- Micropipetas 10 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL.
- Papel lente para laboratorio
- Papel aluminio
- Lejía
- Papel toalla
- Parafilm
- Mascarilla descartable
- Guantes de nitrilo descartables
- Mandil descartable
- Gorro descartable
- Botas descartables
- Material de escritorio: Bolígrafo, forro de plástico, papel bond A4, Cuaderno de laboratorio, sobre manila, marcador indeleble, Tóner para impresora, archivador, sello, tintero para huella digital.
- DNAZap PCR DNA Degradation Solutions

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

6.2.6. Equipos

- Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- Analizador genético SeqStudio™ (Applied Biosystems)
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek)

G. VARGAS

- Sistema de documentación de geles OmniDoci (Cleaver Scientific)
- Cabina de PCR (ESCO®)
- Cámara de electroforesis horizontal profesional (Cleaver)
- Fuente poder (Cleaver)
- Balanza analítica (Shimadzu)
- Agitador magnético (Velp)
- Refrigeradores a 4ºC (Thermo Scientific)
- Refrigeradores a 4ºC (Miray)
- Congeladora a -20°C (Miray)
- Microondas
- Picocentrífuga
- Vórtex
- Cronómetro
- Computadoras de escritorio
- Impresora
- Sistema de alimentación eléctrica ininterrupida
- Estabilizador

6.2.7. Software

- Plate manager (Applied Biosystems)
- Coffalyzer (MRC Holland)
- Gen5TM versión 2.0 (Biotek)

I. TAGLE L.

6.3. SERVICIOS

- Servicios de agua
- Servicio de luz
- Servicio de internet
- Aire acondicionado
- Uso del laboratorio especializado

P. MAZZETTI S

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Este procedimiento requiere uso de un equipo de alto costo "analizador genético", imprescindible para la determinación del número variable de copias (CVN) del gen DMD.

A. CARRASCO

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCEDIMIENTO

N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
	INICIO			
1	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO	Documento de Consentimiento Informado firmado	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
2	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
3	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO *Preliquidación* Solicitar la preliquidación del procedimiento *Liquidación* Liquidar el costo del procedimiento o Trámite de aprobación del SIS	 Sello de Preliquidación Boleta de Pago Orden con dos sellos	 Oficina de Preliquidación Ventanilla CAJA Ventanilla SIS	 Contabilidad Contabilidad SIS

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

		de SIS		
4	REGISTRAR LOS DATOS DEL PACIENTE	Información registrada en base de datos Solicitud de procedimiento molecular	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
5	EXTRACCIÓN DE ADN (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN	Alícuota de ADN con concentración 10 -20 ng/uL	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
7	PROTOCOLO DE GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN *DMD* *Denaturación de ADN* Etiquetar strips de 0.2 mL y agregar 5 uL de ADN (10-20ng/uL). Colocar en el termociclador y ejecutar el programa siguiente: Denaturación inicial a 98°C por 5 minutos, mantener a 25°C. *Reacción de hibridización* Preparar el master mix para la reacción de hibridización (para cada reacción): 1.5 uL de Buffer MLPA + 1.5 uL del mix de pruebas. Homogenizar usando vórtex. Agregar 3uL del master mix de hibridización a cada reacción. Homogenizar por pipeteo. Continuar con el siguiente programa: Reacción de Hibridización a 95°C por 1 minuto y 60°C por 16-20 horas. *Reacción de Ligamiento* Preparar el master mix de Ligasa: Para cada reacción, 25uL de agua ultrapura, 3uL de Buffer A de Ligasa, 3uL de Buffer B de Ligasa y 1uL de Enzima Ligasa-65. Homogenizar por pipeteo. Colocar las muestras a 54°C y agregar 32uL del master mix Ligasa a cada reacción y homogenizar por pipeteo. Continuar con el siguiente programa: 54°C por 15 minutos, 98°C por 5 minutos y mantener a 20°C. *Reacción de PCR* Preparar el master mix de polimerasa. Agregar 7.5uL de agua ultrapura, 2uL de cebadores SALSA y 0.5uL de polimerasa SALSA. A temperatura ambiente, agregar 10uL de master mix de polimerasa a cada reacción. Mezclar por pipeteo. Continuar con el programa: 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos; 72°C por 20 minutos y mantener a 15°C. *Preparación de placa de fragmentos* En una placa compatible con el equipo proceder con los siguientes pasos: Preparar una mezcla de 12 µL de Formamida 0.8 µL Marcador GeneScan™ 500 LIZ, por cada muestra a evaluarse. Dispensar 12 µL de la mezcla en cada pocillo de la placa. Añadir 0.8 µL del ADN. Denaturalizar las muestras a 98°C por 5 minutos. Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador. *Electroforesis capilar* Una vez preparada la placa, las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar. Se emplearán las condiciones recomendadas por el fabricante. Para programar las condiciones de electroforesis capilar se debe tener en cuenta que el rango de amplificación varía entre 100 a	Análisis del número variable de copias (CNV) gen *DMD*	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548 - RNE 1556

	500 pb, los marcadores empleados están marcados con 6-FAM y que el patrón de peso molecular está marcado con GeneScan™ 500 LIZ. *Análisis de resultados* Empleando el programa Coffanalyzer, analizar el DQ (cantidad de dosis) de los fragmentos generados (anexo 3).			
9	REGISTRO Y REPORTE DE PROCEDIMIENTO Registrar "Reporte de laboratorio a disposición" en base de datos "Genotipificaciones".	Información registrada en base de datos y Reporte de genotipificación para gen *DMD*	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
FIN				

IX. RECOMENDACIONES

- Todo estudio genético debe ser realizado previo consentimiento informado que autorice el procedimiento genético.
- La solicitud de la prueba genética y la entrega del reporte de resultado, debe realizarse directamente con la persona afectada en el contexto de una evaluacion médica y de asesoramiento genético que incluye evaluación pretest, test y postest.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

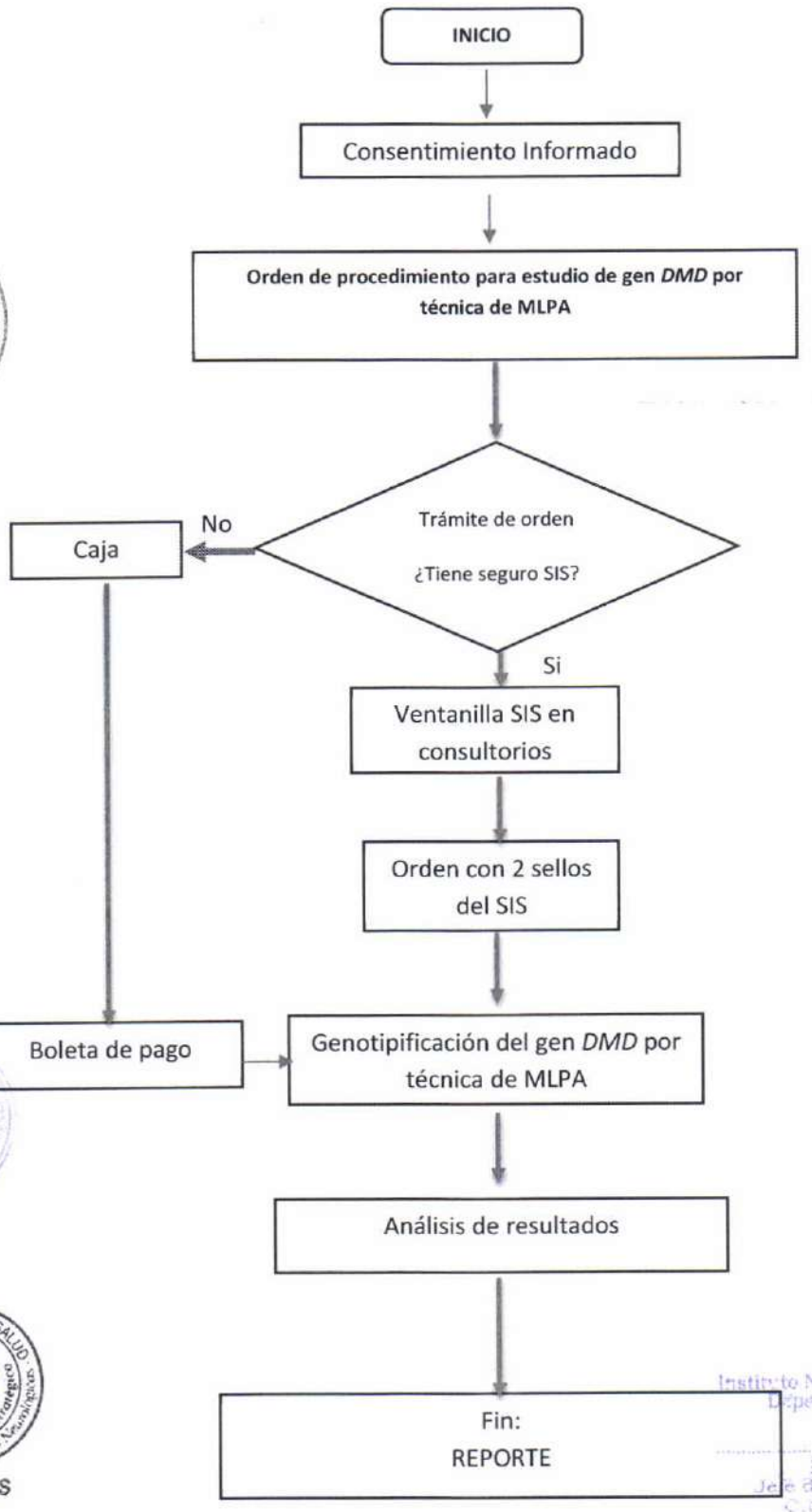
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Francia
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16568 - RNE [illegible]

X. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO PARA ESTUDIO DE GEN *DMD* POR TÉCNICA DE MLPA



ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

El ADN es la sustancia que se encuentra en nuestras células y controla tanto su funcionamiento como la herencia. En el laboratorio de Neurogenética del Centro de Investigación Básica en Neurogenética (CIBN) del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), hacemos exámenes que nos permiten encontrar cambios en el ADN, llamados mutaciones. Se requiere una muestra de sangre, de hisopado bucal u otros tejidos para obtener el ADN, según la solicitud del médico tratante. La muestra será empleada exclusivamente para estudio genético relacionado con su enfermedad. No nos es posible emplear su muestra para otros exámenes como hemoglobina, glucosa, etc. Identificar los cambios o mutaciones en el ADN puede tomar varios meses.

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

El estudio genético nos permitirá conocer el diagnóstico preciso de su enfermedad y poder darle así una atención más específica; así como también una orientación sobre su evolución, pronóstico y posible tratamiento. También le permitirá tomar decisiones de vida con la información más adecuada.

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

El resultado puede confirmar su enfermedad, descartarla o algunas veces ser incierto o poco claro; en este último caso, no podríamos precisar el diagnóstico. La entrega de resultados se realiza como parte de una consulta especial donde le daremos información sobre su enfermedad y los riesgos para Usted y su familia, es por ello que no informamos resultados por teléfono. En el tiempo que se le haya indicado que demore el procesamiento de su muestra, Ud. debe coordinar una cita para entrega de resultados y/o asesoría genética.

¿Cuáles son las molestias y riesgos para Ud. al realizar el estudio genético?

Las molestias que Ud. sentirá en la obtención de sangre será algo de dolor por el pinchazo de la aguja y rara vez podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja o bien una infección en la zona de punción. En este último caso, será atendido por personal de la institución sin costo adicional. Al conocer el resultado, esta información podría ocasionarle preocupación y temor por las consecuencias personales, familiares, laborales y sociales de llevar una enfermedad hereditaria, para lo cual se le brindará apoyo y orientación en consultas especiales de asesoría. Igualmente, si otras personas saben que uno tiene una enfermedad hereditaria, otros miembros de la familia o las personas alrededor de uno pueden discriminarnos.

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

He sido informado(a) acerca de la posibilidad de realizarme un estudio genético y he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias acerca del procedimiento; estoy satisfecho(a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1. Que se me extraiga una muestra para estudio genético de:
   Genotipificación del gen:
2. Que se me informe el resultado
3. Que se almacene mi muestra de ADN en el Banco de ADN del CIBN.

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

I. TAGLE L.

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

Yo como responsable del solicitante, doy consentimiento para el estudio genético.

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo: _____

DNI: _____

Fecha y hora: _____

Firma: _____

G. VARGAS

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Dinne Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16568 - RNE 2556

ANEXO 3

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE MLPA

Copy Number status **Male samples vs Male reference samples**	**Dosage quotient**
Normal	0.80 < DQ < 1.20
Homozygous deletion	DQ = 0
Duplication	1.65 < DQ < 2.25
Ambiguous copy number	All other values

Copy Number status **Female samples vs Female reference samples**	**Dosage quotient**
Normal	0.80 < DQ < 1.20
Homozygous deletion	DQ = 0
Heterozygous deletion	0.40 < DQ < 0.65
Heterozygous duplication	1.30 < DQ < 1.65
Heterozygous triplication/ Homozygous duplication	1.75 < DQ < 2.15
Ambiguous copy number	All other values

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología

ANEXO 4

FORMATO DE REPORTE DE RESULTADO PARA ESTUDIO DE GEN *DMD* POR TÉCNICA DE MLPA

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Neurogenética

LABORATORIO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA
PRUEBA GENÉTICA PARA ESTUDIO DE GEN *DMD* POR TÉCNICA DE MLPA

Nombres y Apellidos:	
Fecha de nacimiento	Código de la muestra:
Sexo:	Método de obtención:
Status clínico:	Remitente:
Tipo de muestra:	Fecha de obtención:
Estado de la muestra:	Fecha de emisión de resultado:

RESULTADO MOLECULAR

INTERPRETACIÓN

Los varones tienen 1 copia o "alelo" del gen DMD que se hereda de nuestra madre. Las deleciones o duplicaciones en el gen DMD son causantes de la mayoría de los casos de Distrofia Muscular de Duchenne. El diagnóstico molecular de la Distrofia Muscular de Duchenne se define por la presencia de deleciones o duplicaciones en el gen DMD medidos por el índice de referencia DQ.

Perfil normal: Los varones no afectados presentan un DQ de 1.
Perfil duplicación: Los varones que presentan una duplicación en algún segmento del gen DMD presentan un DQ de 2.
Perfil deleción: Los varones que presentan una deleción en algún segmento del gen DMD presentan un DQ de 0.

Las mujeres tienen 2 copias o "alelos" del gen DMD que se hereda de nuestros padres. Las deleciones o duplicaciones en el gen DMD son causantes de la mayoría de los casos de Distrofia Muscular de Duchenne. El diagnóstico molecular de la Distrofia Muscular de Duchenne se define por la presencia de deleciones o duplicaciones en el gen DMD medidos por el índice de referencia DQ.

Perfil normal: Las mujeres no afectadas presentan un DQ de 2.
Perfil deleción en heterocigosis: Las mujeres que presentan una deleción en algún segmento del gen DMD presentan un DQ de 1.
Perfil duplicación en heterocigosis: Las mujeres que presentan una duplicación en algún segmento del gen DMD presentan un DQ de 3.
Perfil triplicación en heterocigosis: Las mujeres que presentan una triplicación en algún segmento del gen DMD presentan un DQ de 4.

PROCEDIMIENTO

Análisis molecular del gen de *DMD* (cromosoma Xp21.2-p21.1): Amplificación por Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) empleando las sondas PO34 y PO35 (MRC Holland) usando el analizador genético SeqStudio. El análisis de los resultados se realizó con el programa Coffalyser para la determinación de las mutaciones analizadas y su efecto en la traducción de la proteína distrofina.

CONCLUSIONES

- La presencia de .... En el contexto clínico confirma el diagnóstico molecular de Distrofia Muscular de Duchenne/Becker.
- Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
- Este resultado NO descarta el diagnóstico clínico, es necesario complementar el estudio con otras técnicas.
- Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.
- Fecha de entrega de reporte a paciente:

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.pe

Jr. Ancash Nº 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuro...
C.M. P. 15548 ...

ANEXO 5

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ESTUDIO DE GEN *DMD* POR TÉCNICA DE MLPA

TBE 10X	
Tris base	54 mL
Ácido Bórico	27,5 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	200 uL
Enrasar a 500 mL con agua tridestilada.	

Agarosa 0.7%	
Agarosa	0.7 g
TBE 10X	5 mL
Enrasar a 50 mL con agua tridestilada.	

TBE 1X	
TBE 10x	50 mL
Agua tridestilada	450 mL

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16648 - RNE 2656

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Aartsma-Rus, A., Ginjaar, I. B., & Bushby, K. (2016). The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. Journal of Medical Genetics, 53(3), 145-151.

2. Abbs, S., Tuffery-Giraud, S., Bakker, E., Ferlini, A., Sejersen, T., & Mueller, C. R. (2010). Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders, 20(6), 422-427

3. Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., Case, L. E., Clemens, P. R., Cripe, L. Constantin, C. (2010a). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. The Lancet Neurology, 9(1), 77-93

4. Hutton, E. M., & Thompson, M. W. (1976b). Carrier detection and genetic counselling in Duchenne muscular dystrophy: a follow-up study. Canadian Medical Association Journal, 115(8), 749-752.

5. Mah, J. K. (2016). Current and emerging treatment strategies for Duchenne muscular dystrophy. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 12, 1795-1807

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

8 - PRUEBA GENÉTICA PARA NEUROPATIAS HEREDITARIAS SENSITIVO-MOTORA POR MLPA

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de las Neuropatías Hereditarias sensitivo-motora, a través de una guía técnica para para estudio del gen *PMP22* por la técnica de MLPA, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de análisis de la variación del número de copias del gen *PMP22* a través de la técnica de *Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA)*.

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Guía técnica de aplicación obligatoria por el personal del laboratorio de Neurogenética del Servicio y Centro de Investigación en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO

CPT: 81479 - PRUEBA GENÉTICA PARA ESTUDIO DE GEN *PMP22* POR TÉCNICA DE MLPA

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- Consentimiento Informado: Procedimiento mediante el cual se garantiza que el sujeto ha expresado voluntariamente su intención de participar en una prueba genética.

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- Neuropatía hereditaria sensitivo-motora:
- MLPA: método basado en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cuantificación relativa del número de copias normales y anormales del ADN. Tiene aplicación tanto en investigación como en diagnóstico.
- Electroforesis capilar: Técnica utilizada para separar las diferentes moléculas presentes en una disolución de acuerdo con la relación masa/carga de las mismas.
- Nucleótido: es una molécula que es la unidad estructural básica y el bloque de construcción del ADN y/o ARN, una de sus partes es una base nitrogenada las cuales pueden ser adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) o uracilo (U).
- Gen PMP22. Gen ubicado en la región cromosómica 17p12. Variantes patogénicas en este gen están asociadas a neuropatías hereditarias sensitivo-motoras.
- Genotipo humano: en el contexto de un estudio molecular, se refiere a los dos alelos o formas heredadas de un gen (o una variante de un gen) especifico de un individuo.
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico, contiene la información de las características hereditarias y las secuencias para la creación de aminoácidos que generarán proteínas para el funcionamiento de un organismo.

G. VARGAS

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

- 01 biólogo genetista o con entrenamiento en biología molecular.
- 01 técnico de laboratorio.
- 01 médico neurólogo.
- 01 médico genetista.

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

- SALSA MLPA P405 CMT1 probemix (MRC Holland)
- SALSA MLPA EK1 reagent kit (MRC Holland)
- Agua ultrapura libre de nucleasa
- GeneScan LIZ 500 dye Size Standard
- Hi-Di Formamide
- SeqStudio Genetic Analyzer Cartridge
- SeqStudio™ Cathode Buffer Container
- SeqStudio Integrated Capillary Protector

6.2.2. Reactivos químicos

- Agarosa
- Tris
- Ácido Bórico
- EDTA 0.5M pH 8.0
- Safe-Green™ (ABM)
- Agua tridestilada

6.2.3. Material de plástico

- Tips con filtro 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL
- Tubos de PCR 0.2 mL
- Microamp™ 8-Tube Strip, 0.2mL
- Microamp™ 8-Cap Strip
- Tubos de centrífuga 2 mL
- Gradillas para tubos de 0.2 mL
- Gradillas para tubos de 2 mL
- Pisetas
- Cathode Buffer Container Reservoir Septa for SeqStudio Genetic Analyzer
- MicroAmp® 96-Well Tray/Retainer Set
- Estación congelada para PCR
- Placa de cultivo de 96 pocillos
- Soporte para micropipetas
- Septa for 0.2 mL MicroAmp tubes
- Cathode Buffer Container Reservoir Septa for SeqStudio Genetic Analyzer

6.2.4. Material de vidrio

- Matraz aforado de 500 mL
- Probeta de 1000 mL
- Erlenmeyer 250mL
- Vasos de precipitados de 50 mL
- Pipeta de vidrio 10 mL
- Pipeta de vidrio de 5 mL.
- Propipetas
- Baguetas

6.2.5. Otros materiales

- Micropipetas 10 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL.
- Papel lente para laboratorio
- Papel aluminio
- Lejía
- Papel toalla
- Parafilm
- Mascarilla descartable
- Guantes de nitrilo descartables
- Mandil descartable
- Gorro descartable
- Botas descartables
- Material de escritorio: Bolígrafo, forro de plástico, papel bond A4, Cuaderno de laboratorio, sobre manila, marcador indeleble, Tóner para impresora, archivador, sello, tintero para huella digital.
- DNAZap PCR DNA Degradation Solutions

6.2.6. Equipos

- Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- Analizador genético SeqStudio™ (Applied Biosystems)
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- Sistema de documentación de geles OmniDoci (Cleaver Scientific)
- Cabina de PCR (ESCO®)
- Cámara de electroforesis horizontal profesional (Cleaver)
- Fuente poder (Cleaver)
- Balanza analítica (Shimadzu)
- Agitador magnético (Velp)
- Refrigeradores a 4ºC (Thermo Scientific)
- Refrigeradores a 4ºC (Miray)
- Congeladora a -20°C (Miray)
- Microondas
- Picocentrífuga
- Vórtex
- Cronómetro

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16508 - PNP

- Computadoras de escritorio
- Impresora
- Sistema de alimentación eléctrica ininterrupida
- Estabilizador

6.2.7. Software

- Plate manager (Applied Biosystems)
- Coffalyzer (MRC Holland)
- Gen5™ versión 2.0 (Biotek)

6.3. SERVICIOS

- Servicios de agua
- Servicio de luz
- Servicio de internet
- Aire acondicionado
- Uso del laboratorio especializado

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Este procedimiento requiere uso de un equipo de alto costo "analizador genético", imprescindible para la determinación del número variable de copias (CVN) del gen *PMP22*.

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCEDIMIENTO

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO				
N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
		INICIO		
1	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO	Documento de Consentimiento Informado firmado	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
2	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
3	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO *Preliquidación* Solicitar la preliquidación del procedimiento *Liquidación* Liquidar el costo del procedimiento o Trámite de aprobación del SIS	 Sello de Preliquidación Boleta de Pago Orden con dos sellos de SIS	 Oficina de Preliquidación Ventanilla CAJA Ventanilla SIS	 Contabilidad Contabilidad SIS
4	REGISTRAR LOS DATOS DEL PACIENTE	Información registrada en base de datos Solicitud de procedimiento molecular	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
5	EXTRACCIÓN DE ADN (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN	Alícuota de ADN con concentración 10 -20 ng/uL	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
7	PROTOCOLO DE GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN *PMP22* *Denaturación de ADN*	Análisis del número variable de copias (CNV) gen *PMP22*	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética

	Etiquetar strips de 0.2 mL y agregar 5 uL de ADN (10-20ng/uL). Colocar en el termociclador y ejecutar el programa siguiente: Denaturación inicial a 98°C por 5 minutos, mantener a 25°C. *Reacción de hibridización* Preparar el master mix para la reacción de hibridización (para cada reacción): 1.5 uL de Buffer MLPA + 1.5 uL del mix de pruebas. Homogenizar usando vórtex. Agregar 3uL del master mix de hibridización a cada reacción. Homogenizar por pipeteo. Continuar con el siguiente programa: Reacción de Hibridización a 95°C por 1 minuto y 60°C por 16-20 horas. *Reacción de Ligamiento* Preparar el master mix de Ligasa: Para cada reacción, 25uL de agua ultrapura, 3uL de Buffer A de Ligasa, 3uL de Buffer B de Ligasa y 1uL de Enzima Ligasa-65. Homogenizar por pipeteo. Colocar las muestras a 54°C y agregar 32uL del master mix Ligasa a cada reacción y homogenizar por pipeteo. Continuar con el siguiente programa: 54°C por 15 minutos, 98°C por 5 minutos y mantener a 20°C. *Reacción de PCR* Preparar el master mix de polimerasa. Agregar 7.5uL de agua ultrapura, 2uL de cebadores SALSA y 0.5uL de polimerasa SALSA. A temperatura ambiente, agregar 10uL de master mix de polimerasa a cada reacción. Mezclar por pipeteo. Continuar con el programa: 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos; 72°C por 20 minutos y mantener a 15°C. *Preparación de placa de fragmentos* En una placa compatible con el equipo proceder con los siguientes pasos: Preparar una mezcla de 12 µL de Formamida 0.8 µL Marcador GeneScanTM 500 LIZ, por cada muestra a evaluarse. Dispensar 12 µL de la mezcla en cada pocillo de la placa. Añadir 0.8 µL del ADN. Denaturalizar las muestras a 98°C por 5 minutos. Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador. *Electroforesis capilar* Una vez preparada la placa, las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar. Se emplearán las condiciones recomendadas por el fabricante. Para programar las condiciones de electroforesis capilar se debe tener en cuenta que el rango de amplificación varía entre 100 a 500 pb, los marcadores empleados están marcados con 6-FAM y que el patrón de peso molecular está marcado con GeneScan™ 500 LIZ. *Análisis de resultados* Empleando el programa Coffanalyzer, analizar el DQ (cantidad de dosis) de los fragmentos generados (anexo 1).			
9	REGISTRO Y REPORTE DE PROCEDIMIENTO • Registrar "Reporte de laboratorio a disposición" en base de datos "Genotipificaciones".	Información registrada en base de datos y Reporte de genotipificación para gen *PMP22*	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
	FIN			

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16548 - RNE 7536

IX. RECOMENDACIONES

- Todo estudio genético debe ser realizado previo consentimiento informado que autorice el procedimiento genético.
- La solicitud de la prueba genética y la entrega del reporte de resultado, debe realizarse directamente con la persona afectada en el contexto de una evaluacion médica y de asesoramiento genético que incluye evaluación pretest, test y postest.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

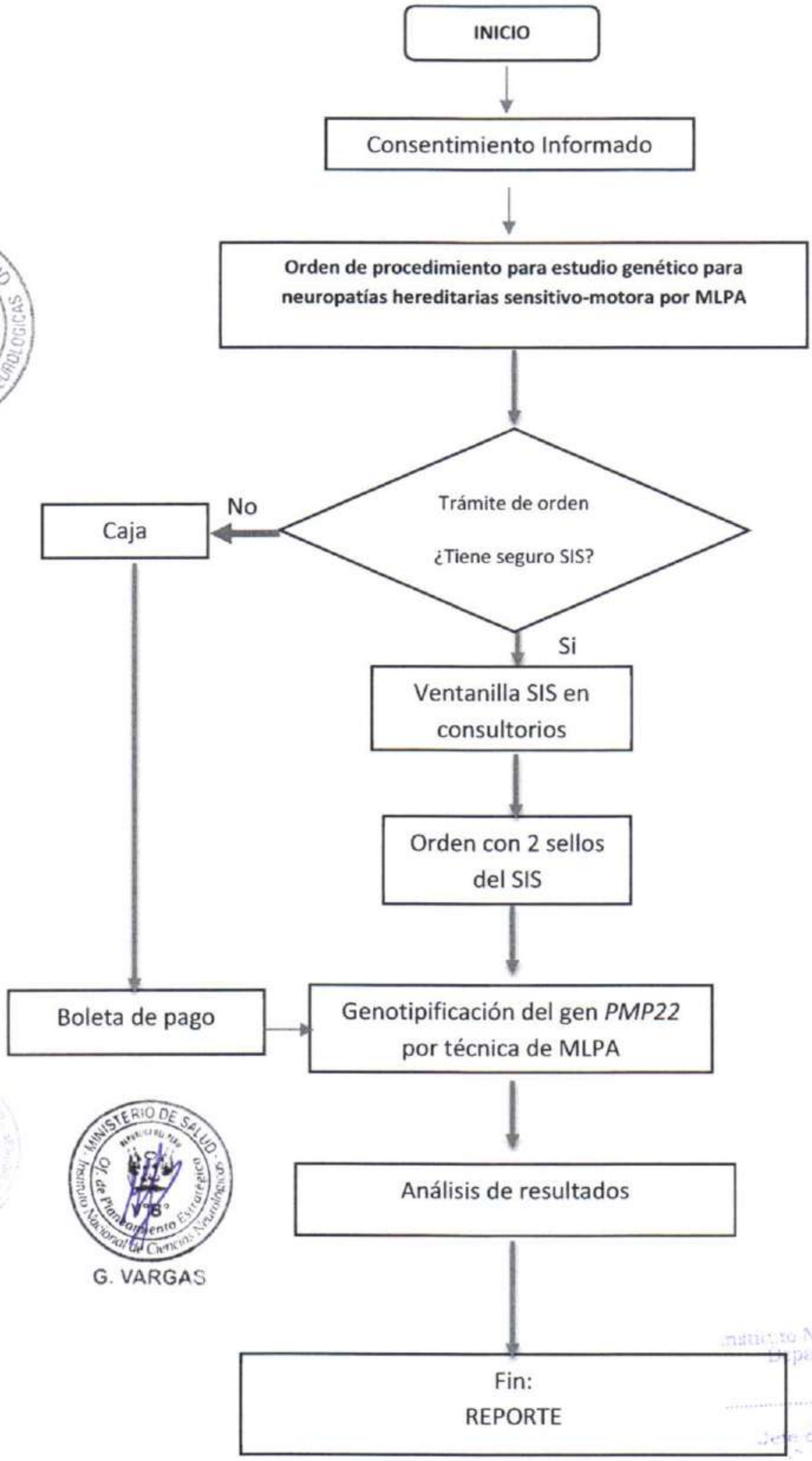
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Alvas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 18268 - RNE 556

X. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO PARA ESTUDIO GENÉTICO PARA NEUROPATIAS HEREDITARIAS SENSITIVO-MOTORA POR MLPA



I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

El ADN es la sustancia que se encuentra en nuestras células y controla tanto su funcionamiento como la herencia. En el laboratorio de Neurogenética del Centro de Investigación Básica en Neurogenética (CIBN) del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), hacemos exámenes que nos permiten encontrar cambios en el ADN, llamados mutaciones. Se requiere una muestra de sangre, de hisopado bucal u otros tejidos para obtener el ADN, según la solicitud del médico tratante. La muestra será empleada exclusivamente para estudio genético relacionado con su enfermedad. No nos es posible emplear su muestra para otros exámenes como hemoglobina, glucosa, etc. Identificar los cambios o mutaciones en el ADN puede tomar varios meses.

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

El estudio genético nos permitirá conocer el diagnóstico preciso de su enfermedad y poder darle así una atención más específica; así como también una orientación sobre su evolución, pronóstico y posible tratamiento. También le permitirá tomar decisiones de vida con la información más adecuada.

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

El resultado puede confirmar su enfermedad, descartarla o algunas veces ser incierto o poco claro; en este último caso, no podríamos precisar el diagnóstico. La entrega de resultados se realiza como parte de una consulta especial donde le daremos información sobre su enfermedad y los riesgos para Usted y su familia, es por ello que no informamos resultados por teléfono. En el tiempo que se le haya indicado que demore el procesamiento de su muestra, Ud. debe coordinar una cita para entrega de resultados y/o asesoría genética.

¿Cuáles son las molestias y riesgos para Ud. al realizar el estudio genético?

Las molestias que Ud. sentirá en la obtención de sangre será algo de dolor por el pinchazo de la aguja y rara vez podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja o bien una infección en la zona de punción. En este último caso, será atendido por personal de la institución sin costo adicional. Al conocer el resultado, esta información podría ocasionarle preocupación y temor por las consecuencias personales, familiares, laborales y sociales de llevar una enfermedad hereditaria, para lo cual se le brindará apoyo y orientación en consultas especiales de asesoría. Igualmente, si otras personas saben que uno tiene una enfermedad hereditaria, otros miembros de la familia o las personas alrededor de uno pueden discriminarnos.

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

He sido informado(a) acerca de la posibilidad de realizarme un estudio genético y he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias acerca del procedimiento; estoy satisfecho(a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1. Que se me extraiga una muestra para estudio genético de:
   Genotipificación del gen:
2. Que se me informe el resultado
3. Que se almacene mi muestra de ADN en el Banco de ADN del CIBN.

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

Yo como responsable del solicitante, doy consentimiento para el estudio genético.

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo: _____

DNI: _____

Fecha y hora: _____

Firma: _____

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16548 - RNE

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS

ANEXO 3

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE MLPA

Copy Number status for *PMP22* and *MPZ* (male and female) and *GJB1* (female)	**Copy Number status for *GJB1* (male)**	**Dosage quotient**
Normal	Normal	0.80 < DQ < 1.20
Homozygous deletion	Deletion	DQ = 0
Heterozygous deletion		0.40 < DQ < 0.65
Heterozygous duplication		1.30 < DQ < 1.65
Heterozygous triplication/ Homozygous duplication	Duplication	1.75 < DQ < 2.15
Ambiguous copy number	Ambiguous copy number	All other values

MINISTERIO DE SALUD V° B° SERVICIO DE NEUROGENÉTICA INST. NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS

INSTITUTO NACIONAL C.N. V° B° DIRECCIÓN

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 16582 - RNE

ANEXO 4

FORMATO DE REPORTE DE RESULTADO PARA ESTUDIO GENÉTICO PARA NEUROPATIAS HEREDITARIAS SENSITIVO-MOTORA POR MLPA

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Neurogenética

LABORATORIO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA- INCN
RESULTADO DE ANALISIS MOLECULAR PARA CHARCOT MARIE TOOTH

Nombres y Apellidos:	
Fecha de nacimiento	Código de la muestra:
Sexo:	Método de obtención:
Status clínico:	Remitente:
Tipo de muestra:	Fecha de obtención:
Estado de la muestra:	Fecha de emisión de resultado:

Paciente es enviado para estudio molecular por diagnóstico clínico de neuropatía Charcot Marie Tooth.

RESULTADO MOLECULAR
Presencia de un alelo con DELECIÓN/DUPLICACIÓN de la región
Presencia de ambos alelos sin alteraciones.

INTERPRETACIÓN
El diagnóstico de Charcot Marie Tooth se establece en un paciente mediante la detección de DELECIÓN/DUPLICACIÓN de región CMT1A/CMT2A (incluye el gen *PMP22/KIF1b*).

PROCEDIMIENTO:
El estudio molecular para genotipificación de la región CMT1A, consiste en la aplicación de la técnica de MLPA (SALSA®MLPA® Kit P033-B2 CMT1) a partir de ADN genómico, la técnica consiste en la valoración de la dosis (dupliación/deleción) de la región 17p11, por medio de electroforesis capilar del producto MLPA y el análisis del producto mediante el software Coffalyser.Net.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

Esta es una prueba basada en investigación. Se recomendaría una confirmación adicional mediante otro método si se traduce para uso clínico.

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.pe

Jr. Ancash Nº 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Pratchett
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 15568

ANEXO 5

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ESTUDIO DE GEN *DMD* POR TÉCNICA DE MLPA

TBE 10X	
Tris base	54 mL
Ácido Bórico	27,5 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	200 uL
Enrasar a 500 mL con agua tridestilada.	

Agarosa 0.7%	
Agarosa	0.7 g
TBE 10X	5 mL
Enrasar a 50 mL con agua tridestilada.	

TBE 1X	
TBE 10x	50 mL
Agua tridestilada	450 mL

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Schouten JP et al. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligationdependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 30:e57.

2. Schwartz M et al. (2007). Deletion of exon 16 of the dystrophin gene is not associated with disease. Hum Mutat. 28:205.

3. Varga RE et al. (2012). MLPA-based evidence for sequence gain: pitfalls in confirmation and necessity for exclusion of false positives. Anal Biochem. 421:799-801.

4. Weterman et al. (2010). Copy number variation upstream of PMP22 in Charcot-Marie-Tooth disease. Eur J Hum Genet. 18(4):421-428.

5. Zhang et al. (2010). Mechanisms for Nonrecurrent genomic rearrangements associated with CMT1A or HNPP: rare CNVs as a cause for missing heritability. Am J Hum Genet. 86:892-903.

6. Brown SB et al. (2014). Point Mutation Analysis of PMP22 in Patients Referred for Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies. Open J Genet. 4(6):426-433.

7. Gui B et al. (2016). A new next-generation sequencing-based assay for concurrent preimplantation genetic diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and aneuploidy screening. J Genet Genomics. 43(3):155-159.

8. Milley GM et al. (2018). Genotypic and phenotypic spectrum of the most common causative genes of Charcot-Marie-Tooth disease in Hungarian patients. Neuromuscul Disord. 28(1):38-43.

9. Shahrizaila N et al. (2014). X-linked Charcot-Marie-Tooth disease predominates in a cohort of multiethnic Malaysian patients. Muscle Nerve. 49(2):198-201.

10. Wang R et al. (2015). Clinical and genetic spectra in a series of Chinese patients with Charcot-Marie-Tooth disease. Clin Chim Acta. 451 (pt B):263-270.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología

9 - PRUEBA GENÉTICA PARA ATAXIA DE FRIEDREICH

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de la Ataxia de Friedreich (AF) a través de una guía técnica para la genotipificación del número de repeticiones GAA en el gen *FTX*, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de genotipificación del microsatélite GAA del gen *FXN* en apoyo al diagnóstico de la Ataxia de Friedreich.

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Guía técnica de aplicación obligatoria por el personal del Laboratorio de Neurogenética del Servicio y Centro de Investigación en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

CPT: 81479 - PRUEBA GENÉTICA DE ATAXIA DE FREIEDREICH

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- Ataxia de Friedreich (FRDA): enfermedad neurodegenerativa causada por microsatélite GAA anormalmente expandido en el gen FXN.
- Consentimiento Informado: Procedimiento mediante el cual se garantiza que el sujeto ha expresado voluntariamente su intención de participar en una prueba genética.
- Genotipificación del gen *FXN*: proceso de la determinación del genotipo de un individuo con respecto al número de repeticiones GAA en el gen *FXN*.

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- Gen FXN. gen ubicado en la región autosómica 9q21.11.
- Electroforesis capilar: Técnica utilizada para separar las diferentes moléculas presentes en una disolución de acuerdo con la relación masa/carga de las mismas.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- Genotipo humano: en el contexto de un estudio molecular, se refiere a los dos alelos o formas heredadas de un gen (o una variante de un gen) especifico de un individuo.
- ADN: ácido Desoxirribonucleico.

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

- 01 biólogo genetista o con entrenamiento en biología molecular.
- 01 técnico de laboratorio.

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

- 01 médico neurólogo.
- 01 médico genetista.

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

- Friedreich's Ataxia GAA Repeat Genotyping GScanTM V2 Kit (Gene Link)
- Agua ultrapura libre de nucleasa
- GeneScan LIZ 500 dye Size Standard
- Hi-Di Formamide
- SeqStudio Genetic Analyzer Cartridge
- SeqStudio™ Cathode Buffer Container
- SeqStudio Integrated Capillary Protector

6.2.2. Material de plástico

- Micropipetas 10 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL.
- Tips con filtro 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL
- Tubos de PCR 0.2 mL
- Microamp™ 8-Tube Strip, 0.2mL
- Microamp™ 8-Cap Strip
- Tubos de centrífuga 1.5 mL
- Gradillas para tubos de 0.2 mL y 1.5 mL
- Pisetas
- Cathode Buffer Container Reservoir Septa for SeqStudio Genetic Analyzer
- MicroAmp® 96-Well Tray/Retainer Set
- Estación congelada para PCR
- Soporte para micropipetas

6.2.3. Otros materiales

- Papel lente para laboratorio
- Lejía
- Papel toalla
- Mascarilla descartable
- Guantes de nitrilo descartables
- Mandil descartable
- Gorro descartable
- Botas descartables
- Material de escritorio: Bolígrafo, forro de plástico, papel bond A4, Cuaderno de laboratorio, sobre manila, marcador indeleble, Tóner para impresora.
- DNAZap PCR DNA Degradation Solutions

6.2.4. Equipos

- Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- Analizador genético SeqStudio™ (Applied Biosystems)

- Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- Sistema de documentación de geles OmniDoci (Cleaver Scientific)
- Cabina de PCR (ESCO®)
- Refrigeradores a 4ºC (Thermo Scientific)
- Refrigeradores a 4ºC (Miray)
- Congeladora a -20°C (Miray)
- Picocentrífuga
- Vórtex
- Computadoras de escritorio
- Impresora
- Sistema de alimentación eléctrica ininterrupida
- Estabilizador

6.2.5. Software

- Plate manager (Applied Biosystems)
- GeneMapper™ Software 5 (Applied Biosystems)
- Gen5™ versión 2.0 (Biotek)

6.3. SERVICIOS

- Servicios de agua
- Servicio de luz
- Servicio de internet
- Aire acondicionado
- Uso del laboratorio especializado

I. TAGLE L.

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Este procedimiento requiere uso de un equipo de alto costo "analizador genético", imprescindible para la determinación del tamaño de repeticiones GAA de los genes mencionados.

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
	INICIO			
1	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO	Documento de Consentimiento Informado firmado	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
2	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
3	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO *Preliquidación* Solicitar la preliquidación del procedimiento *Liquidación* Liquidar el costo del procedimiento o Trámite de aprobación del SIS	 Sello de Preliquidación Boleta de Pago Orden con dos sellos de SIS	 Oficina de Preliquidación Ventanilla CAJA Ventanilla SIS	 Contabilidad Contabilidad SIS
4	REGISTRAR LOS DATOS DEL PACIENTE	Información registrada en base	Área Clínica	Servicio de Neurogenética

P. MAZZETTI S.

A. CARRASCO

G. VARGAS

		de datos Solicitud de procedimiento molecular		
5	EXTRACCIÓN DE ADN (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN	Alícuota de ADN con concentración 100 ng/uL	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
7	PROTOCOLO DE GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE GAA DEL GEN FXN *Preparación de mix de PCR:* Para cada reacción preparar: PREMIX: 10 uL de FRDA Gscan Component A, 4uL de Gscan Component M, 2uL Gscan Component N,9 uL de agua estéril ENZIMA: 3uL de Premix+0.5uL de Taq Polymerase. Mezclar 21uL de PCR premix, 1u de ADN (100ng de ADN) y 3uL de enzima. Purificar los productos amplificados. Colocar en el termociclador y ejecutar el programa siguiente: 30 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, hibridación a 58°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 3 minutos, seguido por un paso de extensión final a 72°C por 7 minutos. *Preparación de placa de fragmentos:* En una placa compatible con el equipo proceder con los siguientes pasos: Preparar una mezcla de 18 µL de Formamida 0.5 µL Marcador GeneScanTM 600 LIZ, por cada muestra a evaluarse. Dispensar 12 µL de la mezcla en cada pocillo de la placa. Añadir 1 µL del ADN obtenido en las reacciones de PCR Denaturalizar las muestras a 98°C por 5 minutos. Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador. *Electroforesis capilar* Una vez preparada la placa, las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar. Se emplearán las condiciones recomendadas por el fabricante. Para programar las condiciones de electroforesis capilar se debe tener en cuenta que el rango de amplificación varía entre 100 a 500 pb, los marcadores empleados están marcados con 6-FAM y que el patrón de peso molecular está marcado con GeneScanTM 500 LIZ. *Análisis de resultados* Empleando el programa Genemapper, analizar el tamaño de los fragmentos generados. El resultado será un electroferograma con picos de intensidad determinada y separados de manera proporcional al tamaño del fragmento.	Genotipo para los alelos de microsatélites GAA	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
8	REGISTRO Y REPORTE DE PROCEDIMIENTO Registrar "Reporte de laboratorio a disposición" en base de datos "Genotipificaciones".	Información registrada en base de datos y Reporte de genotipificación para FRDA	Laboratorio de Neurogenética (biólogo genetista y medico genetista)	Servicio de Neurogenética
	FIN			

INSTITUTO NACIONAL C.N. DIRECCIÓN

MINISTERIO DE SALUD V° B° INST. NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS SERVICIO DE NEUROGENÉTICA

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

P. MAZZETTI S

G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurogenética
Diana Nivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neurogenética
C.M. P. 15548 - RNE 7356

IX. RECOMENDACIONES

- Todo estudio genético debe ser realizado previo proceso de consentimiento informado que autorice el procedimiento genético.
- La solicitud de la prueba genética y la entrega del reporte de resultado, debe realizarse directamente con la persona afectada en el contexto de una evaluación médica y de asesoramiento genético que incluye evaluación pre-test, test y post-test.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

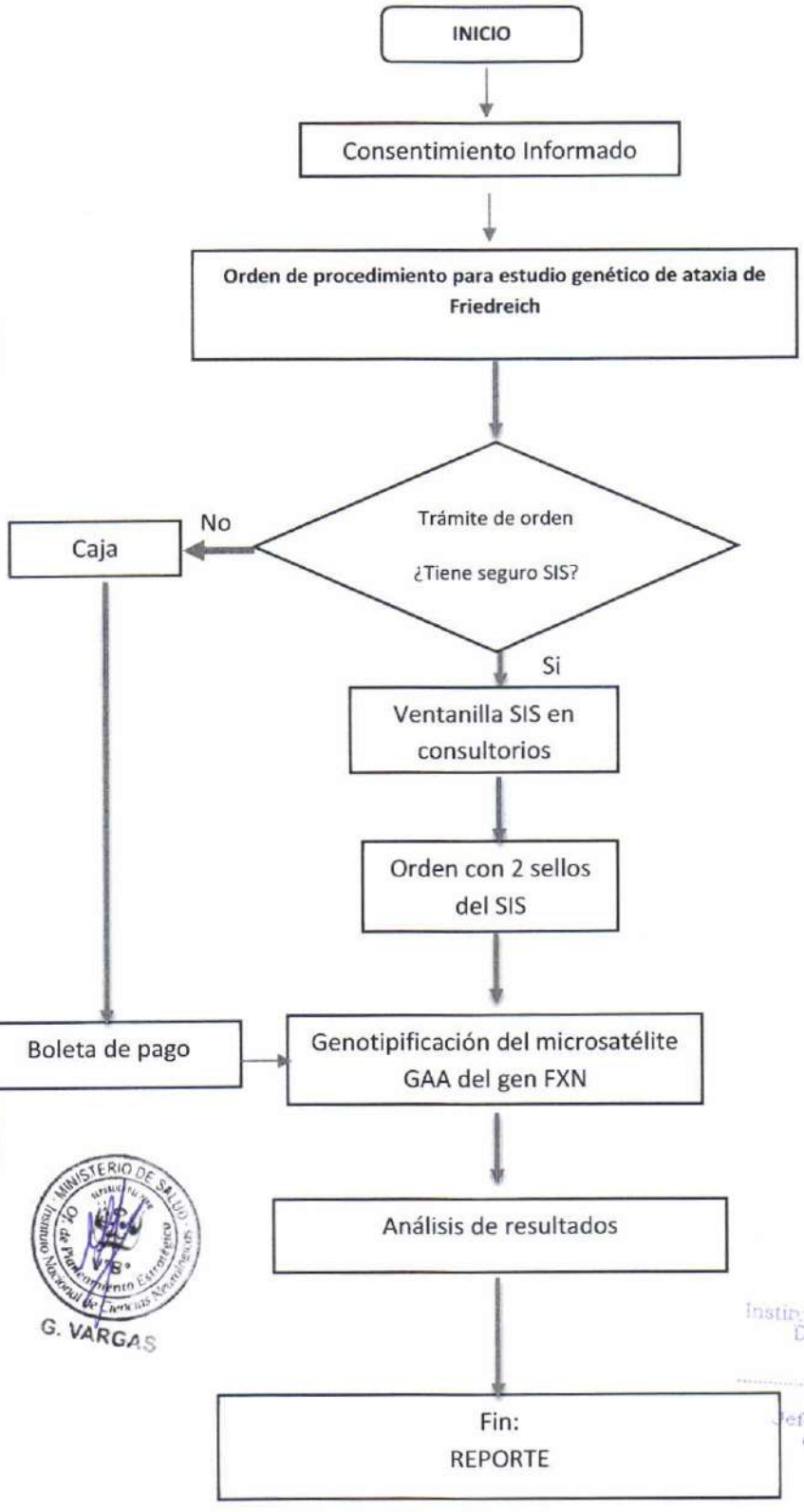
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología

X. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA DE ATAXIA DE FRIEDREICH



I. TAGLE L.
P. MAZZETTI S
G. VARGAS
A. CARRASCO
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuro...

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

El ADN es la sustancia que se encuentra en nuestras células y controla tanto su funcionamiento como la herencia. En el laboratorio de Neurogenética del Centro de Investigación Básica en Neurogenética (CIBN) del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), hacemos exámenes que nos permiten encontrar cambios en el ADN, llamados mutaciones. Se requiere una muestra de sangre, de hisopado bucal u otros tejidos para obtener el ADN, según la solicitud del médico tratante. La muestra será empleada exclusivamente para estudio genético relacionado con su enfermedad. No nos es posible emplear su muestra para otros exámenes como hemoglobina, glucosa, etc. Identificar los cambios o mutaciones en el ADN puede tomar varios meses.

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

El estudio genético nos permitirá conocer el diagnóstico preciso de su enfermedad y poder darle así una atención más específica; así como también una orientación sobre su evolución, pronóstico y posible tratamiento. También le permitirá tomar decisiones de vida con la información más adecuada.

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

El resultado puede confirmar su enfermedad, descartarla o algunas veces ser incierto o poco claro; en este último caso, no podríamos precisar el diagnóstico. La entrega de resultados se realiza como parte de una consulta especial donde le daremos información sobre su enfermedad y los riesgos para Usted y su familia, es por ello que no informamos resultados por teléfono. En el tiempo que se le haya indicado que demore el procesamiento de su muestra, Ud. debe coordinar una cita para entrega de resultados y/o asesoría genética.

¿Cuáles son las molestias y riesgos para Ud. al realizar el estudio genético?

Las molestias que Ud. sentirá en la obtención de sangre será algo de dolor por el pinchazo de la aguja y rara vez podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja o bien una infección en la zona de punción. En este último caso, será atendido por personal de la institución sin costo adicional. Al conocer el resultado, esta información podría ocasionarle preocupación y temor por las consecuencias personales, familiares, laborales y sociales de llevar una enfermedad hereditaria, para lo cual se le brindará apoyo y orientación en consultas especiales de asesoría. Igualmente, si otras personas saben que uno tiene una enfermedad hereditaria, otros miembros de la familia o las personas alrededor de uno pueden discriminarnos.

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

He sido informado(a) acerca de la posibilidad de realizarme un estudio genético y he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias acerca del procedimiento; estoy satisfecho(a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1. Que se me extraiga una muestra para estudio genético de:
   Genotipificación del gen:
2. Que se me informe el resultado
3. Que se almacene mi muestra de ADN en el Banco de ADN del CIBN.

Nombre completo:
DNI:

Firma: ____________________

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

Yo como responsable del solicitante, doy consentimiento para el estudio genético.

Nombre completo:
DNI:

Firma: ____________________

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo: ____________________
DNI: ____________________
Fecha y hora: ____________________

Firma: ____________________

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S.

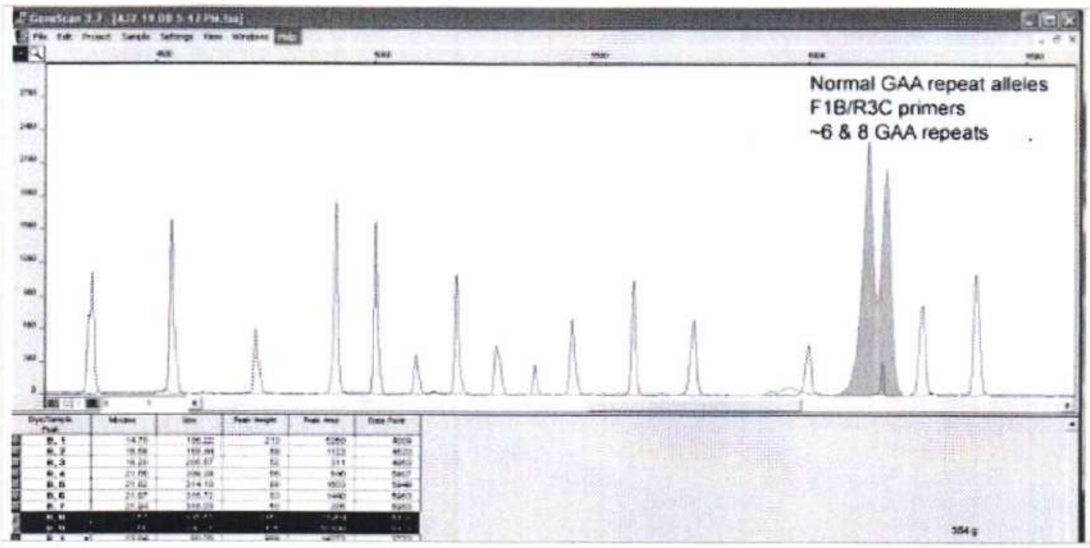
A. CARRASCO

G. VARGAS

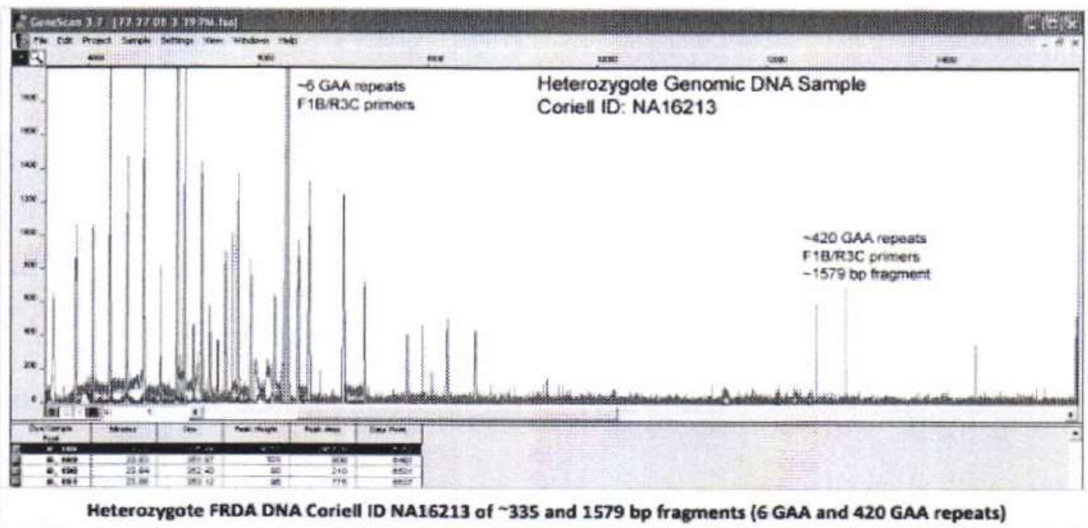
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología

ANEXO 3

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE ELECTROFEROGRAMA DEL GEN FXN



Normal FRDA human genomic DNA GScan™ analysis



Heterozygote FRDA DNA Coriell ID NA16213 of ~335 and 1579 bp fragments (6 GAA and 420 GAA repeats)

I. TAGLE L.

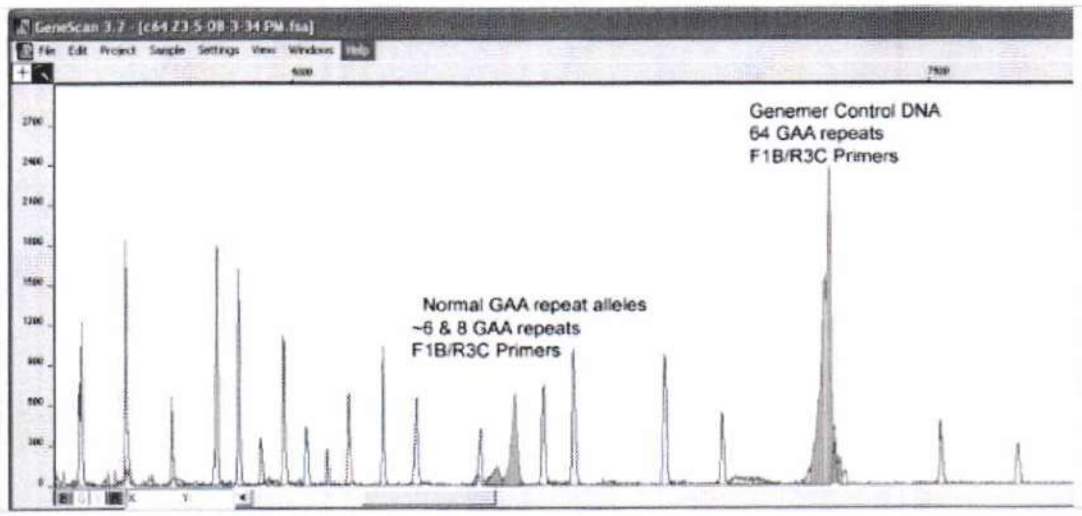
R. MAZZETTI S

A. CARRASCO

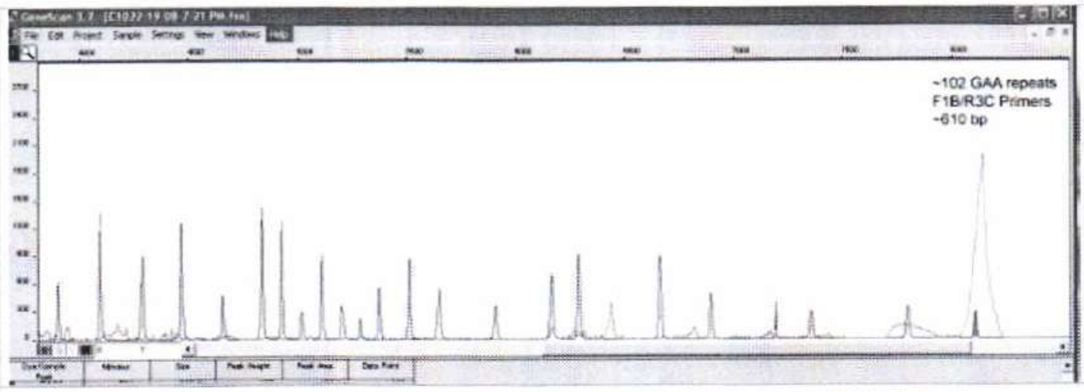
G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología



Human genomic DNA normal FRDA alleles and Gene Link FRDA Genemer™ control DNA (Catalog #: 40-2027-01) 64 GAA repeats ~502 bp fragment.



Gene Link FRDA Genemer™ control DNA (Catalog #: 40-2027-02) 102 GAA repeats ~616 bp fragment.

I. TAGLE L.

A. CARRASCO

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Jefe del Dpto. de Neuropatología

ANEXO 4

FORMATO DE REPORTE DE RESULTADO PARA PRUEBA GENÉTICA DE ATAXIA DE FRIEDREICH

PERÚ | Ministerio de Salud | Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Neurogenética

LABORATORIO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA- INCN
RESULTADO DE ANALISIS MOLECULAR PARA ATAXIA FRIEDREICH

Nombres y Apellidos:	
Fecha de nacimiento	Código de la muestra:
Sexo:	Método de obtención:
Status clínico:	Remitente:
Tipo de muestra:	Fecha de obtención:
Estado de la muestra:	Fecha de emisión de resultado:

Paciente es enviado para estudio molecular por diagnóstico clínico de ataxia.

RESULTADO MOLECULAR
Presencia de ambos alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.
Presencia de ambos alelos con repeticiones encima del rango de normalidad.
Presencia de un alelo con repeticiones encima del rango de normalidad.

Alelo 1: repeticiones GAA.

Alelo 2: repeticiones GAA.

INTERPRETACIÓN
El diagnóstico de Ataxia Friedreich se establece en un paciente mediante la detección de variantes patogénicas bialélicas en gen *FRDA:*

Alelos normales: de 5 a 33 repeticiones GAA.
Alelos normales mutables: de > 34- 45 repeticiones GAA.
Alelos con penetrancia completa, patológico: de 66 A 1800 repeticiones GAA.

La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1, los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.

PROCEDIMIENTO:
El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones en GAA en el intrón 1 del gen *FRDA*, consiste en la amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones GAA por electroforesis capilar con marcador de peso molecular, se realizó con *Friedreich's Ataxia GScan™ Kits.*

I. TAGLE L.

G. VARGAS

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

Esta es una prueba basada en investigación. Se recomendaría una confirmación adicional en una nueva muestra si se traduce para uso clínico.

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.pe

Jr. Ancash Nº 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Durr, A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Penet C, Mandel JL, et al (1996) Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. New Engl J Med 335:1169 1175.

2. Campuzano V, Montermini L, Moltó MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, Monros E, et al (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. Science 271:1423 1427.

3. Patel PI andGrazia Isaya G (2001) Friedreich Ataxia: FromGAATriplet Repeat Expansion to FrataxinDeficiency. Am. J. Hum. Genet., 69:15-24.

4. Simon A. B. Knight, S.A.B; Kim, R;Pain,Dand Dancis,A. (1999) The Yeast Connection to Friedreich Ataxia. Am. J. Hum. Genet., 64:365- 371.

5. Monrós, E. et al. (1997) Am. J. Hum. Genet. 61: 101-110.

6. Castro, M. et al. (2000) Hum. Genet. 106: 86-92.

7. Pook MA, Al Mahdawi SA, Thomas NH, Appleton R, Norman A, Mountford R, Chamberlain S (2000) Identification of three novel frameshift mutations in patients with Friedreich's ataxia. J Med Genet 37:E38.

8. Bradley JL, Blake JC, Chamberlain S, Thomas PK, Cooper JM, Schapira AH (2000) Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. Hum Mol Genet 9:275 282.

9. Ohshima K, Montermini L, Wells RD, Pandolfo M (1998) Inhibitory effects of expanded GAA.TTC triplet repeats from intron I of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. J Biol Chem 273:14588 14595

10. Bidichandani SI, Ashizawa T, Patel PI (1998) The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. Am J Hum Genet 62:111 121.

11. Bradley JL, Blake JC, Chamberlain S, Thomas PK, Cooper JM, Schapira AH (2000) Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. Hum Mol Genet 9:275 282.

12. De Michele G, Cavalcanti F, Criscuolo C, Pianese L, Monticelli A, Filla A, Cocozza S (1998) Parental gender, age at birth and expansión length influence GAA repeat intergenerational instability in the X25 gene: pedigree studies and analysis of sperm from patients with Friedreich's ataxia. Hum Mol Genet 7:1901 1906

13. LeProust EM, Pearso CE, Sinden RR, Gao X (2000) Unexpected formation of parallel duplex in GAA and TTC trinucleotide repeats of Friedreich's ataxia. J Mol Biol 302:1063 1080.

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S

A. CARRASCO

G. VARGAS