

N°041 -2022-DG-INCEN

RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Lima, 22 de Febrero del 2022.

VISTOS:

Exp. Adm. N° 21-015998-001, que contiene el INFORME N° 480-2021-INCEN-NG, de fecha 16 diciembre de 2021, del Jefe del Servicio de Neurogenética, INFORME N° 577-2021-INCEN-NP, de fecha 17 de diciembre de 2021, del Jefe del Departamento de Neuropatología, INFORME N° 268-2021-DEIDAEADT-INCEN, de fecha 20 de diciembre de 2021, del Director Ejecutivo de la Oficina Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento, INFORME N° 004-2022-UO-OEPE/INCEN, de fecha 26 de enero de 2022, del Jefe de la Unidad de Organización de la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico, PROVEIDO N° 022-2022-OEPE/INCEN, de fecha 26 de enero de 2022, del Director Ejecutivo de la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico y el INFORME N° 049-2022-OAJ/INCEN, de fecha 31 de enero de 2022, de la Jefa de la Oficina de Asesoría Jurídica del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, y;

CONSIDERANDO:

Que, los artículos I y II del Título Preliminar de la Ley N° 26842-Ley General de Salud, establecen que *"La salud, es condición indispensable del desarrollo humano y medio fundamental para alcanzar el bienestar individual y colectivo"*, *"La protección de la salud es de interés público. Por tanto, es responsabilidad del Estado regularla, vigilarla y promoverla"*;

Que, el artículo 5 del Reglamento de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo, aprobado mediante Decreto Supremo N° 013-2006-SA, establece que los establecimientos de salud y servicios médicos de apoyo deben contar, en cada área, unidad o servicio, con manuales de procedimientos, guías de práctica clínica referidos a la atención de los pacientes, personal, suministros, mantenimiento, seguridad, y otros que sean necesarios, según sea el caso. En tal sentido el inciso s) del artículo 37 del citado Reglamento, establece que corresponde al Director Médico disponer la elaboración del Reglamento Interno, de las guías de práctica clínica y de los manuales de procedimientos referidos a la atención de los pacientes, personal, suministros, mantenimiento, seguridad, y otros que sean necesarios;

Que, a través de la Resolución Ministerial N° 826-2021/MINSA se aprueba las "Normas para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud", que tiene por finalidad fortalecer el rol de Rectoría del Ministerio de Salud, ordenando la producción normativa de la función de regulación que cumple como Autoridad Nacional de Salud (ANS) a través de sus Direcciones y Oficinas Generales, Órganos Desconcentrados y Organismos Públicos Adscritos, y en el numeral 5.1 define al Documento Normativo



J. MEDINA



D. TEJADA P.



J.M. SIFUENTES

del Ministerio de Salud, a todo aquel documento aprobado por el Ministerio de Salud que tiene por finalidad transmitir información estandarizada y aprobada sobre aspectos técnicos, sean estos asistenciales, sanitarios y/o administrativos, relacionados al ámbito del Sector Salud, en cumplimiento de sus objetivos; así como facilitar el adecuado y correcto desarrollo de competencias, funciones, procesos, procedimientos y/o actividades, en los diferentes niveles de atención de salud, niveles de gobierno y subsectores de salud, según corresponda;

Que, el numeral 6.1.1 del artículo VI, del citado cuerpo normativo señala que la Guía Técnica *"Es el Documento Normativo del Ministerio de Salud, con el que se define por escrito y de manera detallada el desarrollo de determinados procesos, procedimientos y actividades administrativas, asistenciales o sanitarias. En ella se establecen metodologías, instrucciones o indicaciones que permite al operador seguir un determinado recorrido orientándolo al cumplimiento del objetivo de un proceso, procedimientos o actividades y al desarrollo de una buena práctica (...)"*;

Que, el inciso e) del artículo 13° del Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, aprobado con Resolución Ministerial N° 787-2006/MINSA, establece que la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico es la unidad orgánica encargada entre otras, el de *Lograr el diagnóstico y análisis organizacional para formular y mantener actualizados los documentos de gestión en cumplimiento a las normas vigentes para organizar el Instituto Especializado*;

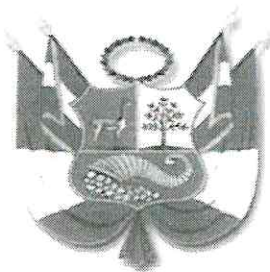
Que, mediante INFORME N° 480-2021-INCN-NG, de fecha 16 diciembre de 2021, el Jefe del Servicio de Neurogenética, solicita al Jefe del Departamento de Neuropatología la aprobación institucional de las siguientes Guías Técnicas de Procedimientos del Servicio de Neurogenética:

1. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación del microsatélite CAG del gen CACNA1A
2. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación del microsatélite CAG del gen ATXN1
3. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación del microsatélite ATTCT del gen ATXN10
4. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación del microsatélite CAG del gen ATXN3
5. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación del microsatélite CAG del gen ATN1 asociado a DRPLA
6. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación del microsatélite CAG del gen PPP2R2B
7. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación del microsatélite CAG/CAA del gen TBP asociado a SCA17
8. Guía Técnica de procedimiento para la prueba genética para encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios tipo ACV (MELAS)

el mismo que es trasladado por el Jefe del Departamento de Neuropatología, con el INFORME N° 577-2021-INCN-NP, de fecha 17 de diciembre de 2021, a fin de que se realicen las gestiones correspondientes para la aprobación de las ocho (08) Guías de Procedimientos del Servicio de Neurogenética;

Que, mediante el INFORME N° 268-2021-DEIDAEADT-INCN, de fecha 20 de diciembre de 2021, el Director Ejecutivo de la Oficina Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento, informa que el Departamento de Neuropatología envía ocho (08) GUIAS DE





N° 041 -2022-DG-INCN

RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Lima, 22 de Febrero del 2022.

PROCEDIMIENTOS ELABORADOS POR EL SERVICIO DE NEUROGENÉTICA para que sea evaluado y de ser conforme aprobado mediante acto resolutivo;

Que, mediante el INFORME N° 004-2022-UO-OEPE/INCN, de fecha 26 de enero de 2022, se cuenta con la opinión favorable del Jefe de la Unidad de Organización de la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico, ratificado por el Director Ejecutivo de la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico con el PROVEIDO N° 022-2022-OEPE/INCN, de fecha 26 de enero de 2022, en cumplimiento con los criterios de la Resolución Ministerial N° 826-2021/MINSA que aprueba las "Normas para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud, aprobando las Guías de Procedimientos elaborados por el Servicio de Neurogenética;

Que, con el propósito de continuar con el desarrollo de las actividades y procesos técnicos 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;

Estando a la opinión favorable emitido por la Dirección Ejecutiva de la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico, es conveniente aprobar las ocho (08) Guías de Procedimientos del Servicio de Neurogenética;

Con la opinión favorable de la Jefa de la Oficina de Asesoría Jurídica;

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

De conformidad con lo dispuesto por la Ley N° 26842, Ley General de Salud, Decreto Supremo N° 013-2006-SA, Resolución Ministerial N° 826-2021/MINSA que aprueba las "Normas para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud", Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, aprobado con Resolución Ministerial N° 787-2006/MINSA,

SE RESUELVE:

Artículo Primero. - **APROBAR** las Guías de Procedimientos del Servicio de Neurogenética del Departamento de Investigación, Docencia y Apoyo al Diagnóstico en Neuropatología del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, que en ciento diez



(110) folios forman parte de la presente Resolución Directoral que se detallan a continuación:

1. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación de microsatélite CAG del gen CACNA1A
2. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación del microsatélite CAG del gen ATXN1
3. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación del microsatélite ATTCT del gen ATXN10
4. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación del microsatélite CAG del gen ATXN3
5. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación del microsatélite CAG del gen ATN1 asociado a DRPLA
6. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación del microsatélite CAG del gen PPP2R2B
7. Guía Técnica de procedimiento para la genotipificación del microsatélite CAG/CAA del gen TBP asociado a SCA17
8. Guía Técnica de procedimiento para la prueba genética para encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios tipo ACV (MELAS)



Artículo Segundo. – 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.

Artículo Tercero. - DISPONER la publicación de la presente Resolución en el Portal Web Institucional del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

Regístrese, comuníquese y cúmplase



MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Dirección General
M.C. Esp. JORGE ENRIQUE MEDINA RUBIO
Director del Instituto Especializado

JEMR/ /CLBV
VISACIONES
D.G



PERÚ

Ministerio
de Salud

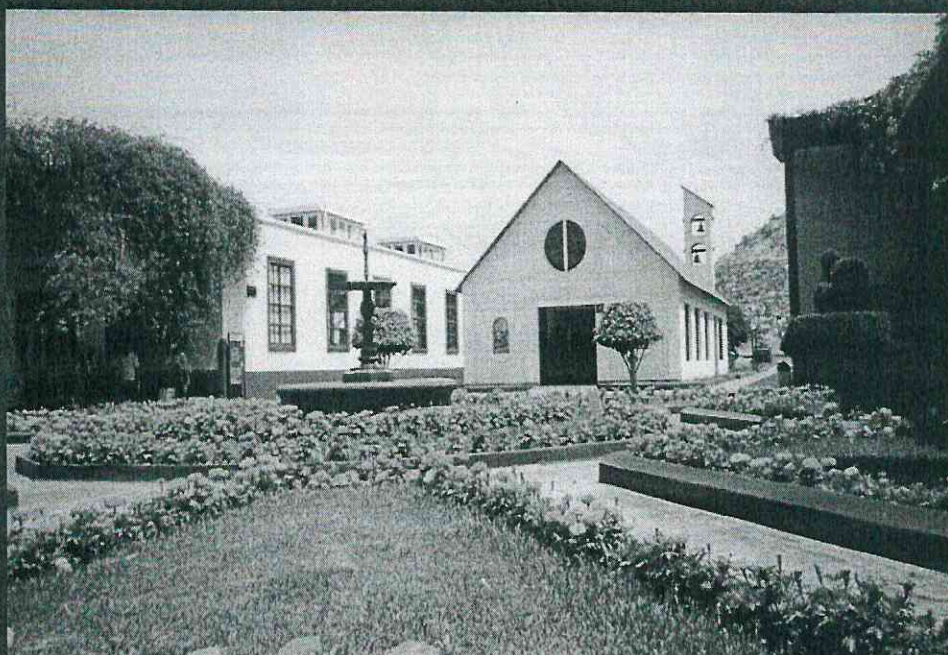
Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

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 AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN CACNA1A



INCN
2022





PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"



Siempre
con el pueblo

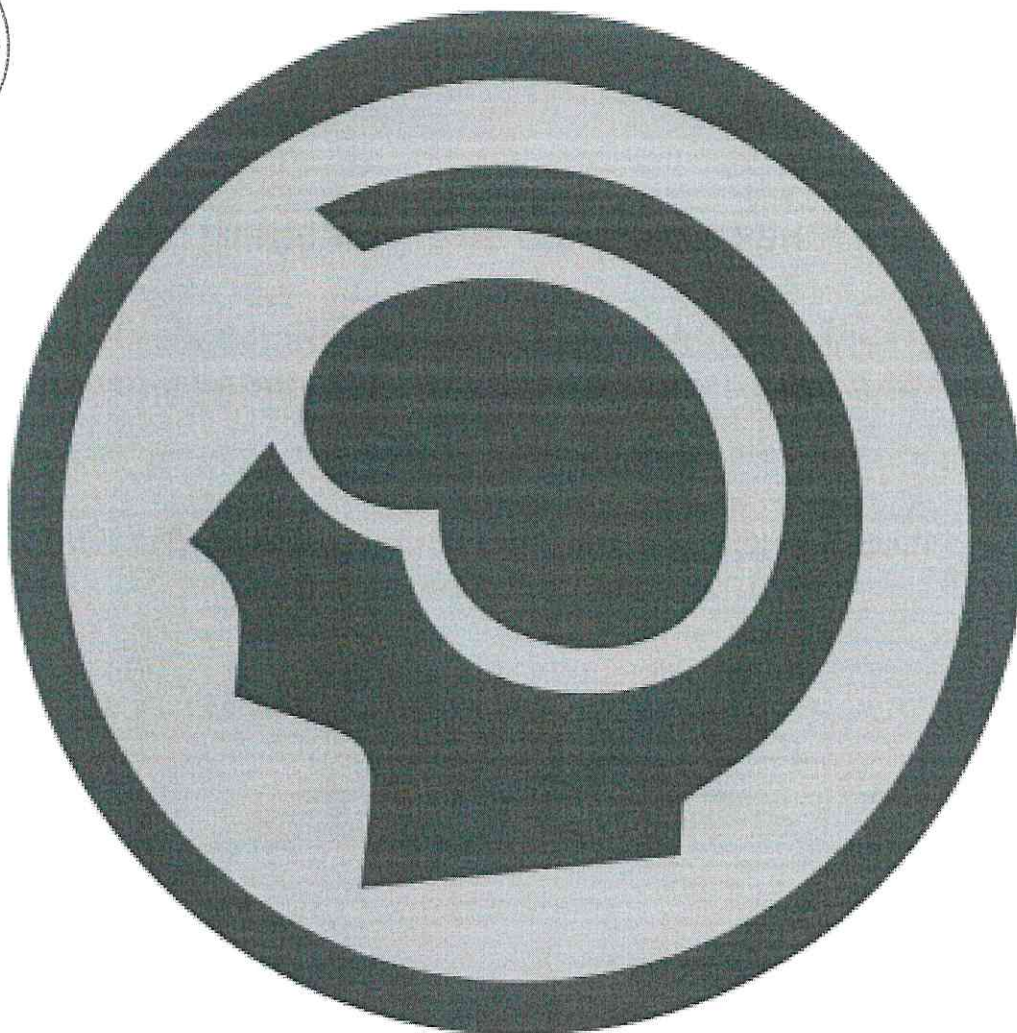


INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS

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

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

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



J. MEDINA

GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN CACNA1A



D. TEJADA P.



DIRECTORIO:

M.C. ESP. JORGE ENRIQUE MEDINA RUBIO
DIRECTOR GENERAL

ECON. DAVID ALEJANDRO TEJADA PARDO
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO

M.C. ESP. JUAN MANUEL SIFUENTES MONGE
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN,
DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

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

M.C. ESP. ELISON SARAPURA CASTRO
JEFE DEL SERVICIO DE NEUROGENÉTICA

APOYO ADMINISTRATIVO:

TEC. LUIS MIGUEL CRUZADO SALAZAR
JEFE DE LA UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

BACH. DIEGO ALEXANDER FERIA ROJAS
UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO



Lima, Perú
2022





ÍNDICE

N°	CONTENIDO	PÁG.
	CUADRO DE CONTROL	05
I.	FINALIDAD	06
II.	OBJETIVO	06
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	06
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	06
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	06
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	06
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	06
	5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS	06
	5.3.1. RECURSOS HUMANOS	06
	5.3.2. MATERIALES	07
	5.3.2.1. IMPLEMENTOS MOLECULARES	07
	5.3.2.2. REACTIVOS QUÍMICOS	07
	5.3.2.3. MATERIAL DE PLÁSTICO	07
	5.3.2.4. MATERIAL DE VIDRIO	08
	5.3.2.5. OTROS MATERIALES	08
	5.3.2.6. EQUIPOS	08
	5.3.2.7. SOFTWARE	08
	5.3.3. SERVICIOS	09
VI.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	09
VII.	RECOMENDACIONES	11
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
IX.	ANEXO	11
	ANEXO N° 01: FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 6 (SCA6)	12





GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN CACNA1A

ROL	ORGANO	FECHA	V° B°
ELABORADO	SERVICIO DE NEUROGENÉTICA	DICIEMBRE, 2021	
REVISADO POR	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROLOGÍA	DICIEMBRE, 2021	
	DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	DICIEMBRE, 2021	
	OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO (UNIDAD DE ORGANIZACIÓN)	ENERO, 2022	
	ASESORÍA JURÍDICA	ENERO, 2022	
APROBADO	DIRECCIÓN GENERAL	ENERO, 2022	



J. MEDINA



D. TEJADA P.

GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN CACNA1A

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 6 (SCA6), a través de una guía técnica para la genotipificación del número de repeticiones CAG del gen CACNA1A, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CAG del gen CACNA1A en apoyo al diagnóstico de la ataxia espinocerebelosa tipo 6 (SCA6).

III. AMBITO DE APLICACIÓN

Guía técnica es de aplicación obligatoria por el personal del Laboratorio de Neurogenética del Servicio de Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN).

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

- 81184 - CACNA1A (subunidad alfa1 del canal dependiente de voltaje de calcio A) (p. ej., análisis de genes de ataxia espinocerebelosa); evaluación para detectar alelos anormales (p. ej., expandidos)

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 CACNA1A: proceso de la determinación del genotipo de un individuo con respecto al número de repeticiones CAG en el gen CACNA1A.

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.
- 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) 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.

5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

5.3.1. RECURSOS HUMANOS

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



5.3.2. MATERIALES

5.3.2.1. Implementos moleculares

- ❖ Cebador SCA6-F: 5'-6-FAM-CACGTGTCCTATTCCCCTGTGATCC-3'
- ❖ Cebador SCA6-R: 5'- TGGGTACCTCCGAGGGCCGCTGGTG-3'
- ❖ dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- ❖ DMSO 100% (Sigma-Aldrich)
- ❖ Agua ultrapura libre de nucleasa
- ❖ 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
- ❖ SeqStudio™ Cathode Buffer Container

5.3.2.2. 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%
- ❖ Formaldehído 37%

5.3.2.3. 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 centrifuga 2 mL
- ❖ Gradilla para tubos de 0.2 mL
- ❖ Gradilla para tubos de 2 mL
- ❖ Pissetas
- ❖ 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



5.3.2.4. 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.

5.3.2.5. 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, 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.

5.3.2.6. Equipos

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

5.3.2.7. Software

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



**5.3.3. SERVICIOS**

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

VI. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO				
Nº	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 <i>Preliquidación</i> Solicitar la preliquidación del procedimiento	Sello de Preliquidación	Oficina de Preliquidación	Contabilidad
	<i>Liquidación</i> Liquidar el costo del procedimiento o	Boleta de Pago	Ventanilla CAJA	Contabilidad
	Trámite de aprobación del SIS	Orden con dos sellos de SIS	Ventanilla SIS	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: <i>Amplificación del microsatélite CAG del gen CACNA1A</i> En la cabina de PCR, preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra: • DMSO 10% • Buffer de PCR para enzima taq platinum 1X • dNTPs 0.125mM c/u • MgCl₂ 0.3mM • Cebador SCA6-F 0.6uM • Cebador SCA6-R 0.6uM • Enzima taq platinum 0.045	Genotipo para los alelos del microsatélite CAG	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética





U/uL

- ADN 0.5 ng/UI

Emplear el siguiente programa de amplificación: 2 minutos de denaturación inicial a 94°C, 29 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, hibridación a 58°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 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 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 muestras 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 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 0.5 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 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 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 GeneScan™ 500 LIZ.

Análisis de resultados y estimación del número de repeticiones

Empleando el programa GeneMapper™, analizar el tamaño de



D. TEJADA P.



J. MEDINA

	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 electroferograma obtenido empleando el estándar de secuencia específica para este procedimiento y los electroferogramas obtenidos por cada muestra analizada.			
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 SCA6	Laboratorio de Neurogenética (biólogo genetista y médico genetista)	Servicio de Neurogenética
FIN				

VII. 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.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Matzura R, Futamura N, Fujimoto Y, Yanagimoto S, Horikawa H, Suzumura A, Takayanagi T. Spinocerebellar ataxia type 6. Molecular and clinical features of 35 Japanese patients including one homozygous for the CAG repeat expansión. 1997 Nov, 49 (5):1238-43.
- Matsuyama Z, et al. Molecular Features of the CAG Repeats of Spinocerebellar Ataxia 6 (SCA6). Hum Mol Genet.1997;6:1283-1287.
- Jodice C, Mantuano E, Veneziano L. et al. Episodic ataxia type 2 (EA2) and spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) due to CAG repeat expansion in the CACNA1A gene on chromosome 19p. Hum Mol Genet.1997;6:1973-197

ANEXOS

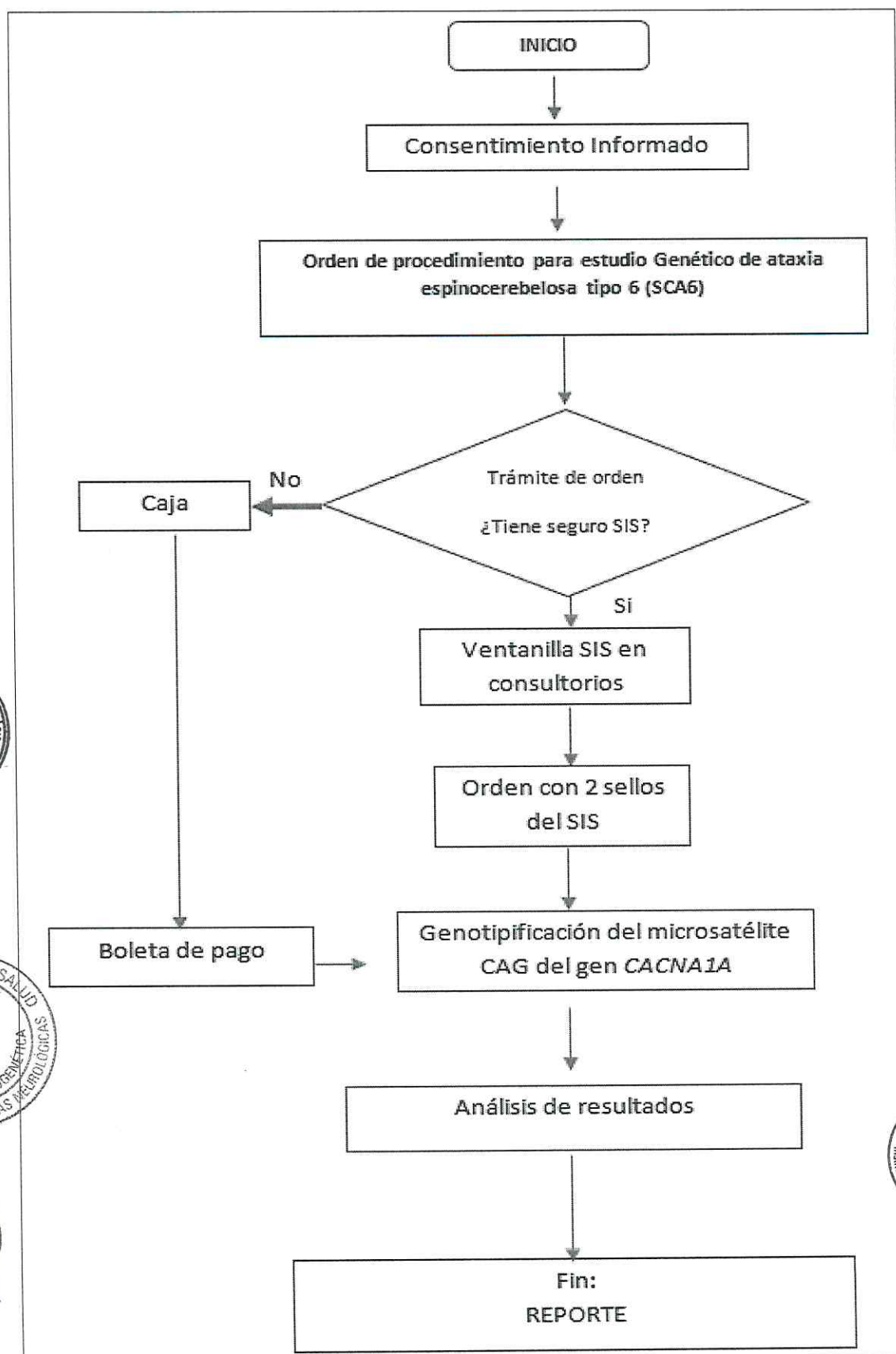
ANEXO 01: FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 6 (SCA6)





ANEXO 01

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 6 (SCA6)





PERÚ

Ministerio
de Salud

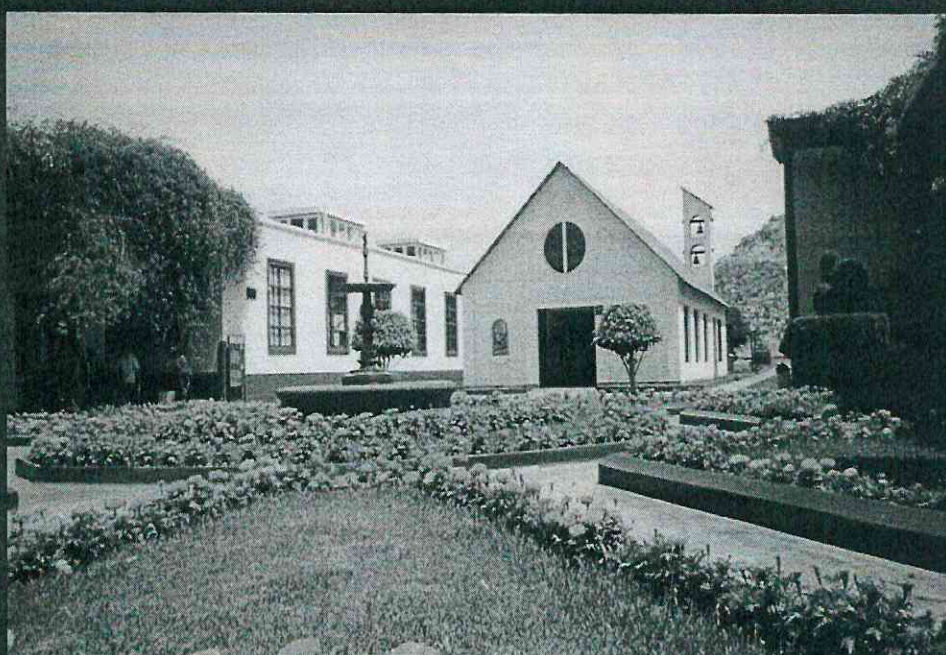
Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

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 AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN
NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN *ATXN1*



INCN
2022



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



PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

Siempre
con el pueblo

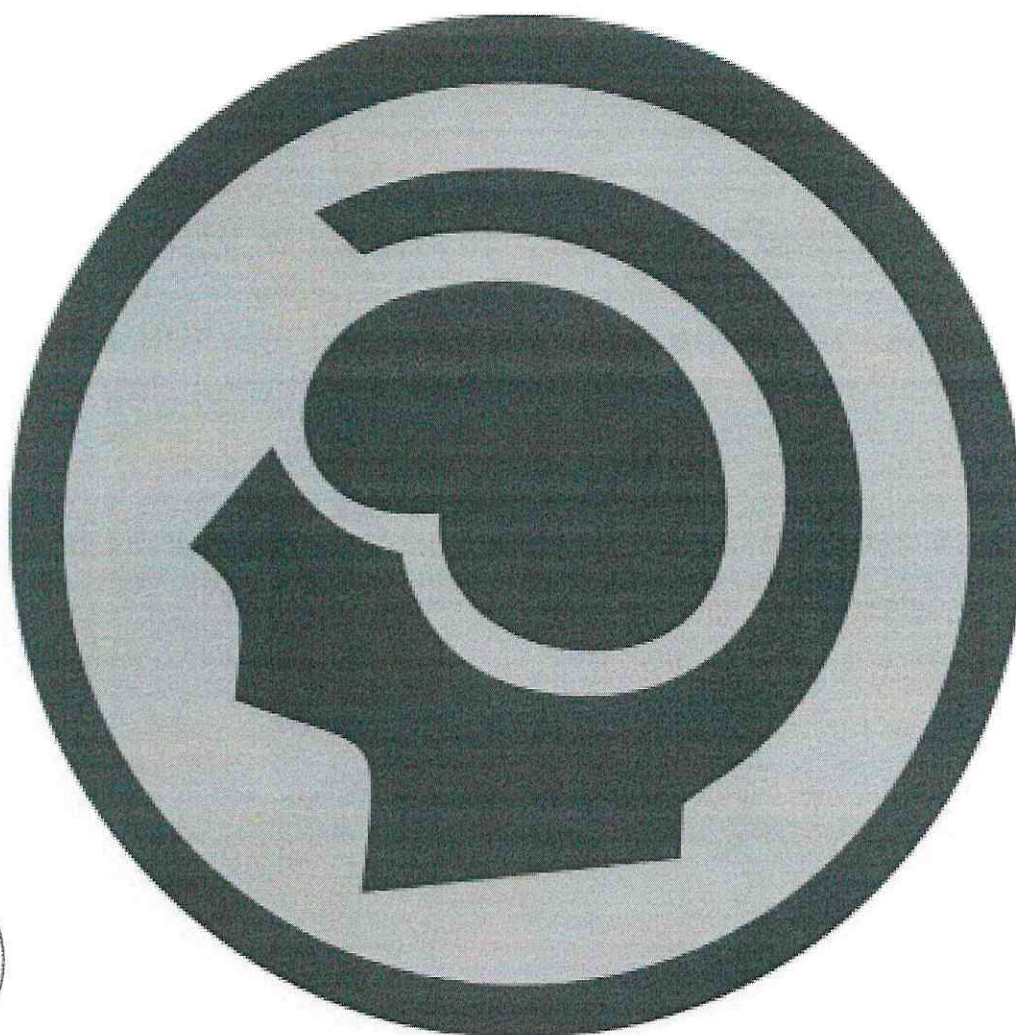


INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS

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

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

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN *ATXN1*



D. TEJADA P.



DIRECTORIO:

M.C. ESP. JORGE ENRIQUE MEDINA RUBIO
DIRECTOR GENERAL

ECON. DAVID ALEJANDRO TEJADA PARDO
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO

M.C. ESP. JUAN MANUEL SIFUENTES MONGE
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN,
DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

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

M.C. ESP. ELISON SARAPURA CASTRO
JEFE DEL SERVICIO DE NEUROGENÉTICA

APOYO ADMINISTRATIVO:

TEC. LUIS MIGUEL CRUZADO SALAZAR
JEFE DE LA UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

BACH. DIEGO ALEXANDER FERIA ROJAS
UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO



Lima, Perú
2022





ÍNDICE

Nº	CONTENIDO	PÁG.
	CUADRO DE CONTROL	05
I.	FINALIDAD	06
II.	OBJETIVO	06
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	06
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	06
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	06
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	06
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	06
	5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS	06
	5.3.1. RECURSOS HUMANOS	06
	5.3.2. MATERIALES	07
	5.3.2.1. IMPLEMENTOS MOLECULARES	07
	5.3.2.2. REACTIVOS QUÍMICOS	07
	5.3.2.3. MATERIAL DE PLÁSTICO	07
	5.3.2.4. MATERIAL DE VIDRIO	08
	5.3.2.5. OTROS MATERIALES	08
	5.3.2.6. EQUIPOS	08
	5.3.2.7. SOFTWARE	09
	5.3.3. SERVICIOS	09
VI.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	09
VII.	RECOMENDACIONES	11
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
IX.	ANEXOS	11
	ANEXO N° 01: FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 1 (SCA1)	12





PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

Siempre
con el pueblo



GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN *ATXN1*

ROL	ORGANO	FECHA	V° B°
ELABORADO	SERVICIO DE NEUROGENÉTICA	DICIEMBRE, 2021	
REVISADO POR	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA	DICIEMBRE, 2021	
	DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	DICIEMBRE, 2021	
	OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO (UNIDAD DE ORGANIZACIÓN)	ENERO, 2022	
	ASESORÍA JURÍDICA	ENERO, 2022	
APROBADO	DIRECCIÓN GENERAL	ENERO, 2022	



D. TEJADA P.



GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN ATXN1

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1), a través de una guía técnica para la genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *ATXN1*, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *ATXN1* en apoyo al diagnóstico de la ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1).

III. AMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

- 81178 - *ATXN1* (ataxina1) (p. ej., ataxia espinocerebelosa) análisis de genes, evaluación para detectar alelos anormales (p. ej., expandidos)

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 *ATXN1*: proceso de la determinación del genotipo de un individuo con respecto al número de repeticiones CAG en el gen *ATXN1*.

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.
- 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) 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.
- Heteroplasmia, diferentes genomas mitocondriales mutados que se encuentran en una misma célula o tejido.

5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

5.3.1. RECURSOS HUMANOS

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





- ✓ 01 médico genetista.
- ✓ 01 médico neurólogo.

5.3.2. MATERIALES

5.3.2.1. Implementos moleculares

- ❖ Cebador SCA1-F: 5'-6-FAM-CAACATGGGCAGTCTGAG-3'
- ❖ Cebador SCA1-R: 5'- AACTGGAAATGTGGACGTAC -3'
- ❖ dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- ❖ DMSO 100% (Sigma-Aldrich)
- ❖ Agua ultrapura libre de nucleasa
- ❖ 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
- ❖ SeqStudio™ Cathode Buffer Container

5.3.2.2. 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%

5.3.2.3. 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 centrifuga 2 mL
- ❖ Gradilla para tubos de 0.2 mL
- ❖ Gradilla para tubos de 2 mL
- ❖ Pissetas.
- ❖ 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.



5.3.2.4. 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.

5.3.2.5. 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, 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.

5.3.2.6. 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 4°C (Thermo Scientific)
- ❖ Refrigeradores a 4°C (Miray)
- ❖ Congeladora a -20°C (Miray)
- ❖ Picocentrífuga
- ❖ Vórtex
- ❖ Cronómetro
- ❖ Computadoras de escritorio
- ❖ Impresora
- ❖ Sistema de alimentación eléctrica ininterrumpida
- ❖ Estabilizador



5.3.2.7. Software

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

5.3.3. SERVICIOS

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

VI. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

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 <i>Preliquidación</i> Solicitar la preliquidación del procedimiento	Sello de Preliquidación	Oficina de Preliquidación	Contabilidad
	<i>Liquidación</i> Liquidar el costo del procedimiento o Trámite de aprobación del SIS	Boleta de Pago Orden con dos sellos de SIS	Ventanilla CAJA Ventanilla SIS	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: <i>Amplificación del microsatélite CAG del gen ATXN1</i> En la cabina de PCR, preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra:	Genotipo para los alelos del microsatélite CAG	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética





- DMSO 10%
- Buffer de PCR para enzima taq platinum 1X
- dNTPs 0.1mM c/u
- MgCl₂ 1.2mM
- Cebador SCA1-F 0.6uM
- Cebador SCA1-R 0.6uM
- Enzima taq platinum 0.05 U/uL
- ADN 0.3 ng/uL

Emplear el siguiente programa de amplificación: 2 minutos de denaturación inicial a 94°C, 26 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, hibridación a 57°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 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 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 muestras 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 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 0.5 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 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 el rango de amplificación varía entre



D. TEJADA P.



	100 a 500 pb, los cebadores empleados están marcados con 6-FAM y que el patrón de peso molecular está marcado con GeneScan™ 500 LIZ. <i>Análisis de resultados y estimación del número de repeticiones</i> 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 electroferograma obtenido empleando el estándar de secuencia específica para este procedimiento y los electroferogramas obtenidos por cada muestra analizada.			
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 SCA1	Laboratorio de Neurogenética (biologo genetista y medico genetista)	Servicio de Neurogenética
FIN				

VII. 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.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Changqiang C, Xuqian F, Shunchang S. 2018. Diagnosis of polyglutamine spinocerebellar ataxias by polymerase chain reaction amplification and Sanger sequencing.

IX. ANEXOS

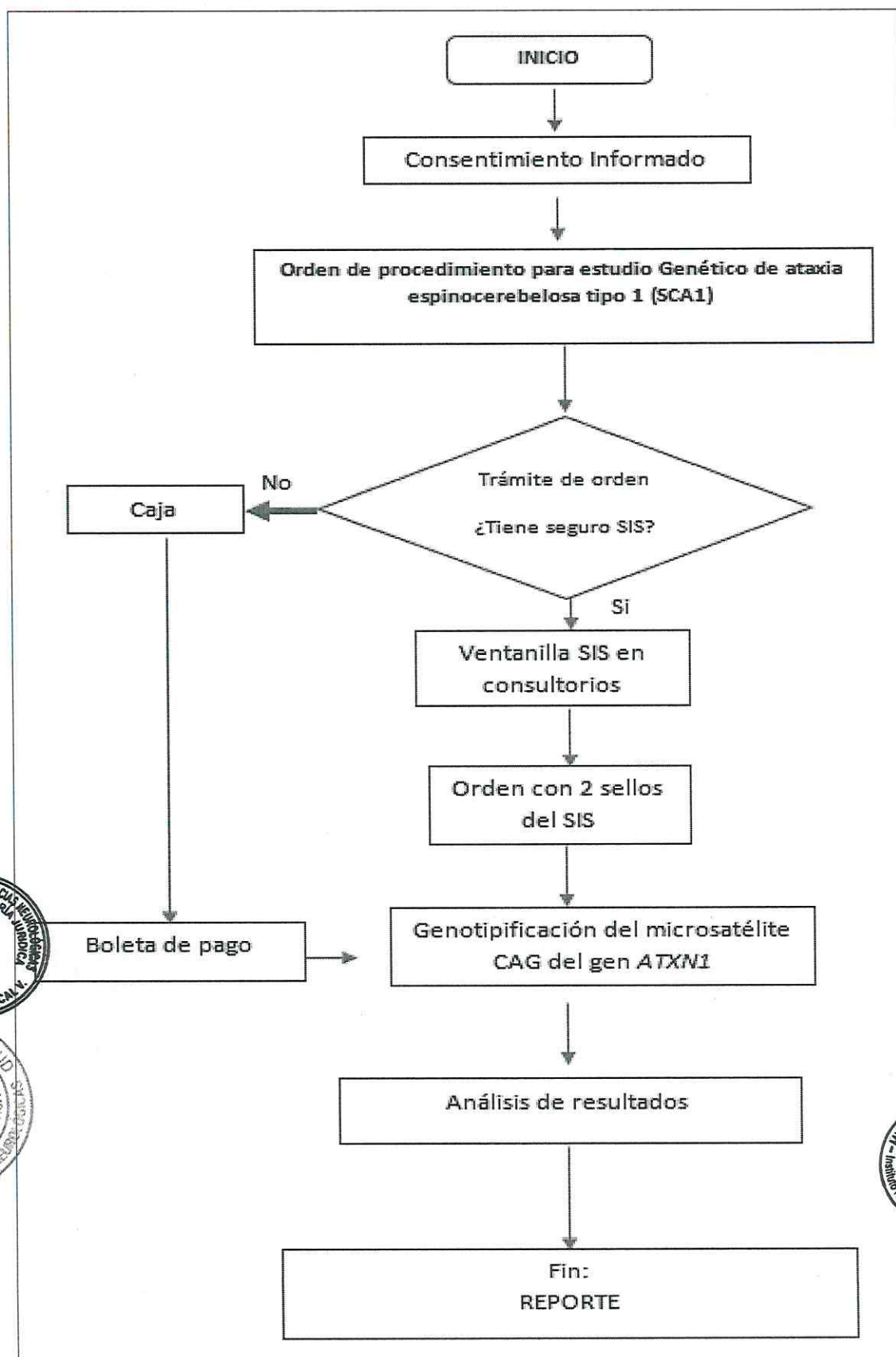
ANEXO 01: FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 1 (SCA1)



D. TEJADA P.

ANEXO 01

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 1 (SCA1)





PERÚ

Ministerio
de Salud

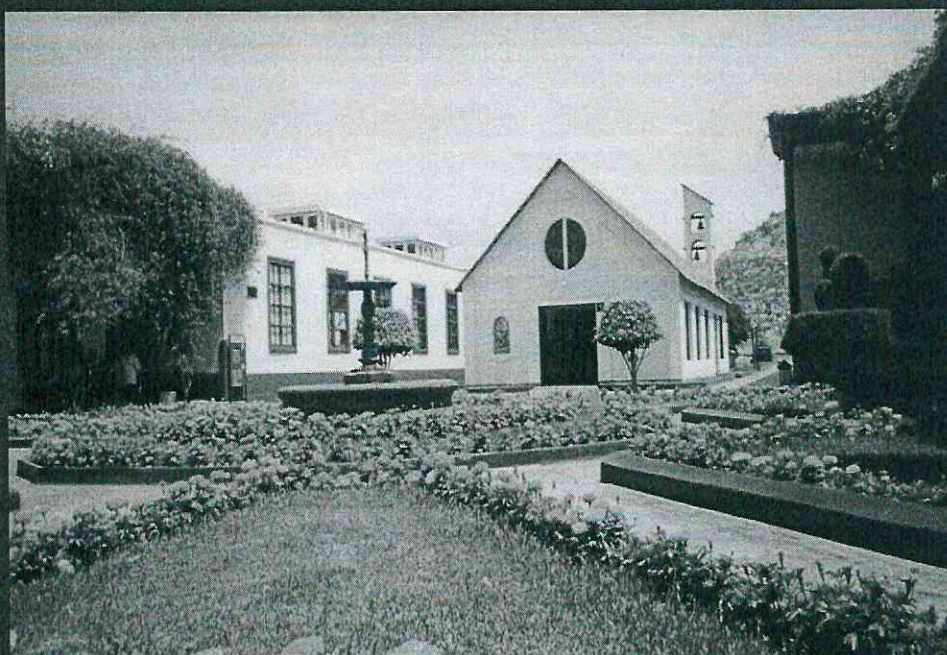
Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

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 AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUIA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 10 (SCA10)



INCN
2022

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



PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

Siempre
con el pueblo



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 AL
APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 10 (SCA10)



PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"



Siempre
con el pueblo



DIRECTORIO:

M.C. ESP. JORGE ENRIQUE MEDINA RUBIO
DIRECTOR GENERAL

ECON. DAVID ALEJANDRO TEJADA PARDO
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO

M.C. ESP. JUAN MANUEL SIFUENTES MONGE
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN,
DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

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

M.C. ESP. ELISON H. SARAPURA CASTRO
JEFE DEL SERVICIO DE NEUROGENÉTICA

APOYO ADMINISTRATIVO:

TEC. LUIS MIGUEL CRUZADO SALAZAR
JEFE DE LA UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

BACH. DIEGO ALEXANDER FERIA ROJAS
UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO



Lima, Perú
2022





ÍNDICE

N°	CONTENIDO	PÁG.
	CUADRO DE CONTROL	05
I.	FINALIDAD	06
II.	OBJETIVO	06
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	06
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	06
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	06
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	06
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	06
	5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS	06
	5.3.1. RECURSOS HUMANOS	06
	5.3.2. MATERIALES	07
	5.3.2.1. IMPLEMENTOS MOLECULARES	07
	5.3.2.2. REACTIVOS QUÍMICOS	07
	5.3.2.3. MATERIAL DE PLÁSTICO	07
	5.3.2.4. MATERIAL DE VIDRIO	07
	5.3.2.5. OTROS MATERIALES	08
	5.3.2.6. EQUIPOS	08
	5.3.2.7. SOFTWARE	08
	5.3.3. SERVICIOS	08
VI.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	08
VII.	RECOMENDACIONES	13
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
IX.	ANEXOS	13
	ANEXO 01: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS	14
	ANEXO 02: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA ATAXIA TIPO 10	15





PERÚ

Ministerio
de SaludViceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en SaludInstituto Nacional
de Ciencias Neurológicas"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"Siempre
con el pueblo

GUIA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 10 (SCA10)

ROL	ORGANO	FECHA	V° B°
ELABORADO	SERVICIO DE NEUROGENÉTICA	DICIEMBRE, 2021	
REVISADO POR	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA	DICIEMBRE, 2021	
	DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	DICIEMBRE, 2021	
	OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO (UNIDAD DE ORGANIZACIÓN)	ENERO, 2022	
	ASESORÍA JURÍDICA	ENERO, 2022	
APROBADO	DIRECCIÓN GENERAL	ENERO, 2022	



D. TEJADA P.



GUIA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 10 (SCA10)

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 10 (SCA10) a través de una guía técnica para la genotipificación del número de repeticiones del pentanucleótido ATTCT, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento. Expansión de la repetición del pentanucleótido ATTCT en el intrón 9 del gen ATXN10 (22q13).

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones ATTCT del gen ATXN10 con una técnica basada en PCR y TP-PCR en apoyo al diagnóstico de la ataxia espinocerebelosa tipo 10 (SCA10).

III. AMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

- 81183 - ATXN10 (ataxina 10) (p. ej., ataxia espinocerebelosa) análisis de genes, evaluación para detectar alelos anormales (p. ej., expandidos)

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- Ataxia espinocerebelosa tipo 10 (SCA10): enfermedad neurodegenerativa causada por el microsatélite ATTCT anormalmente expandido en el gen ATXN10.
- Genotipificación del gen ATXN10: proceso de la determinación del genotipo de un individuo con respecto al número de repeticiones ATTCT en el gen ATXN10.

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- Gen ATXN10: gen ubicado en la región autosómica 22q13.31
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- TP-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con triple cebador.
- 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.
- Consentimiento Informado: Procedimiento mediante el cual se garantiza que el sujeto ha expresado voluntariamente su intención de participar en una prueba genética.
- Genotipificación del pentanucleótido ATTCT por TP-PCR.
- Este procedimiento es complementario a la PCR convencional. Se aplica en casos que resultan aparentemente homocigotos por PCR. El resultado es cualitativo, sólo determina la presencia o ausencia de un alelo mutado mayor a 33 repeticiones ATTCT que la PCR no pudo detectar.

5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

5.3.1. RECURSOS HUMANOS

- ✓ 01 biólogo con entrenamiento en biología molecular.
- ✓ 01 técnico de laboratorio.
- ✓ 01 médico neurogenetista.
- ✓ 01 médico genetista.



D. TEJADA P.



5.3.2. MATERIALES

5.3.2.1. Implementos moleculares

- ❖ Cebador SCA10-F: 5'-6-FAM- AGAAAACAGATGGCAGAATGA -3'
- ❖ Cebador SCA10-R: 5'- GCCTGGGCAACATAGAGAGA -3'
- ❖ Cebador SCA10-2: 5'-
TACGCATCCCAGTTTGAGACGGAATAGAATAGAATA
GAATAGAATAGAATAGAATAGAATAG -3'
- ❖ Cebador SCA10-3: 5'- TACGCATCCCAGTTTGAGACG-3'
- ❖ GeneAmp® dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- ❖ DMSO 100% (Sigma-Aldrich)
- ❖ Platinum® Taq DNA polymerase 5 U/μL (Invitrogen). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl₂ 50 mM.
- ❖ Marcador GeneScan™ 500 LIZ
- ❖ Agua ultrapura libre de nucleasa

5.3.2.2. Reactivos químicos

- ❖ Acrilamida
- ❖ Bisacrilamida
- ❖ TEMED
- ❖ Persulfato de amonio
- ❖ Tris
- ❖ Ácido bórico
- ❖ EDTA 0.5M pH 8
- ❖ Ácido Clorhídrico
- ❖ Xilencianol
- ❖ Azul de Bromofenol
- ❖ Glicerol
- ❖ Etanol absoluto
- ❖ Ácido acético
- ❖ Nitrato de Plata (AgNO₃)
- ❖ Hidróxido de sodio (NaOH)
- ❖ Formaldehído 37%
- ❖ Agua tridestilada

5.3.2.3. 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, 1000 μL
- ❖ Tubos de PCR 0.2 mL
- ❖ Tubos de centrifuga 1.5 mL
- ❖ Gradillas para tubos de 0.2 mL y 1.5 mL
- ❖ Pissetas
- ❖ Estación congelada para PCR
- ❖ Soporte para micropipetas

5.3.2.4. Material de vidrio

- ❖ Matraz aforado
- ❖ Probetas
- ❖ Vasos de precipitados
- ❖ Pipetas 1 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL.
- ❖ Propipetas
- ❖ Frascos
- ❖ Baguetas
- ❖ Botellas para reactivos químicos



5.3.2.5. Otros materiales

- ❖ Papel Lente
- ❖ Tiras reactivas de pH
- ❖ Mascarilla descartable (N-95 y quirúrgica)
- ❖ 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.
- ❖ Papel aluminio
- ❖ Parafilm

5.3.2.6. Equipos

- ❖ Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- ❖ Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- ❖ Cabina de PCR (ESCO®)
- ❖ Cámara de electroforesis vertical profesional (Cleaver)
- ❖ Fuente poder (Biorad)
- ❖ Balanza analítica (Shimadzu)
- ❖ Centrífuga (Eppendorf)
- ❖ Agitador magnético (Velp)
- ❖ Refrigeradores a 4°C (Thermo Scientific y Miray)
- ❖ Congeladora a -8°C/-20°C (Frigidaire)
- ❖ Picocentrífuga
- ❖ Vórtex
- ❖ Cronómetro
- ❖ Computadora de escritorio
- ❖ Impresora
- ❖ Sistema de alimentación eléctrica ininterrumpida
- ❖ Estabilizador

5.3.2.7. Software

- ❖ Gen5™ versión 2.0 (Biotek)

5.3.3. SERVICIOS

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

VI. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO				
Nº	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
INICIO				
1	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Médico especialista (neurogenetista, médico genetista)	Servicio de Neurogenética



2	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO Tramitar la orden en la oficina de pre liquidación para que coloquen los datos de pre liquidación Pagar Ventanilla del SIS: 2 sellos (ROJO y AZUL)	Boleta de Pago o preliquidación con VB del SIS.	Personal de Oficina de Preliquidación Personal de admisión. Ventanilla CAJA	Contabilidad SIS Contabilidad
3	CONSENTIMIENTO INFORMADO	Formato de consentimiento informado firmado	Personal de área de Toma de Muestra	Servicio de Neurogenética
4	<u>EXTRACCIÓN DE ADN</u> (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
5	<u>PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN</u>	Alícuota de ADN con concentración 10 ng/uL	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	<u>GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE ATTCT POR PCR</u> Amplificación por PCR usando Termociclador Proflex: Preparar la siguiente mezcla de reacción para una muestra problema, una muestra control 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 5 %, 0.8 uL • Buffer de PCR para enzima Taq platinum 1X, 1 U/uL • dNTPs 0.2mM c/u, 0,8 uL • MgCl₂ 1.5mM, 0.3 uL • Mix Cebador: SCA10-F + SCA10-R, 0.2 uM c/u, 0.1uL • Enzima Taq Platinum 0.04 U/uL, 0.1uL • ADN 0.5ng/uL • Completar con agua hasta 10ul Emplear el siguiente programa de amplificación: 2 minutos de denaturación inicial a 94°C, 30	Genotipo para los alelos del microsatélite ATTCT	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética



D. TEJADA P.



J. MEDINA



ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, hibridación a 58°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 45 segundos; seguido por un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Visualización de productos de PCR por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida no denaturante al 6%

Para solo visualizar el producto del PCR, Utilizar una cámara de 10 cm para la electroforesis y correr a 150V durante 75 minutos Sembrar en cada pocillo 2uL de producto de PCR con 2uL de buffer de siembra.

Preparación de placa de fragmentos:

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 0.5 µL del producto de amplificación 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 (periodos < a 24 horas) o a -20°C (periodos > 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.





7	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 - 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 fragmento. La estimación del No de repeticiones ATTCT se realiza con la siguiente formula: #CAG= (pb-127)/5 GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE ATTCT POR TP-PCR En la cabina de PCR, preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra: - Buffer de PCR para enzima Taq Platinum 1X, 1 uL - dNTPs 0.2mM c/u, 0.8 uL - MgCl₂ 1.5mM, 0.3 uL - Cebador: - SCA10-F 1uM, 0.1 uL - SCA10-2 0.1 uM, 0.1 uL - Sca10-3 1uM, 0.1 uL - Enzima Taq Platinum 0.075 U/uL, 0.15 uL - ADN 2 ng/uL, 2 uL - Agua ultrapura hasta completar 10uL. Emplear el siguiente programa de amplificación: 2 minutos de denaturación inicial a 94°C, 30 ciclos de denaturación a 94°C por	Genotipos por TP-PCR	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
---	---	----------------------	------------------------------	---------------------------



D. TEJADA P.



J. MEDINA

30 segundos, hibridación a 60°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 2 minutos; seguido por un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Visualización de los amplificados:

- Electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%.
- Sembrar en cada pocillo 6uL de producto de PCR con 3uL de buffer de siembra.
- Voltaje de corrida: 200V x45 minutos
- Realizar la tinción del gel con el protocolo de tinción argéntica usando solución de nitrato de plata.
- 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

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. Se determina como alelo expandido cuando el patrón de picos supera los 276 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 ATXN10	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
FIN				

VII. 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.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Matsuura, T., Yamagata, T., Burgess, D.L., Rasmussen, A., Grewal, R.P., Watase, K., Khajavi, M., McCall, A.E., Davis, C.F., Zu, L., Achari, M., Pulst, S.M., Alonso, E., Noebels, J.L., Nelson, D.L., Zoghbi, H.Y. y Ashizawa, T., 2000. Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nature genetics*, vol. 26, no. 2, pp. 191-194. ISSN 1061-4036. DOI 10.1038/79911.
- otsi, C., Zamba-papanicolaou, E., Georgiou, A., Kyriakides, T., papacostas, S., Kleopa, K.A., Pantzaris, M. y Christodoulou, K., 2012. Investigation of SCA10 in the Cypriot population: further exclusion of SCA dynamic repeat mutations. *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 323, no. 1-2, pp. 154-157. ISSN 1878-5883. DOI 10.1016/j.jns.2012.09.006.
- Matsuura T, Ashizawa T. Spinocerebellar Ataxia Type 10. 2002 Apr 23 [Updated 2019 Sep 19]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1175>
- Ashizawa T, Matsuura T. [Spinocerebellar ataxia type 10 (SCA10): a disease caused by a novel pentanucleotide repeat expansion]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2001 Dec;41(12):1120-2. Japanese. PMID: 12235814

ANEXO

ANEXO 01: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

ANEXO 02: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA ATAXIA TIPO 10



ANEXO 01

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

POLIACRILAMIDA 21%		TBE 10X	
Bis acrilamida	20 g	Tris	54 g
Acrilamida	1 g	Ácido Bórico	27.5 g
H ₂ O _{dest} hasta 100 mL		EDTA 0.5M pH 8.0	20 ml
		H ₂ O _{dest} hasta 500 mL	
POLIACRILAMIDA NO DENATURANTE AL 6%		TBE 1X	
(Stock de trabajo)			
Poliacrilamida 21%	6 mL	TBE 10X	100 mL
TBE 10X	2.1 mL	H ₂ O _{dest}	900 mL
H ₂ O _{dest}	11.9 mL		
POLIACRILAMIDA NO DENATURANTE AL 8%			
(Stock de trabajo)			
Poliacrilamida 21%	8 mL		
TBE 10X	2.1 mL		
H ₂ O _{dest}	11.9 mL		

TINCIÓN ARGENTICA

SOLUCIÓN A (Fijación)		SOLUCIÓN B (Tinción)		SOLUCIÓN C (Revelado)	
Ácido acético	1 mL	Nitrato de plata	0.3 g	Hidróxido de sodio	3 g
Alcohol absoluto	10 mL	H ₂ O _{dest} hasta 150 mL		H ₂ O _{dest} hasta 150 mL	
H ₂ O _{dest} hasta 150 mL				Agregar Formaldehído al 37%	1 mL



D. TEJADA P.

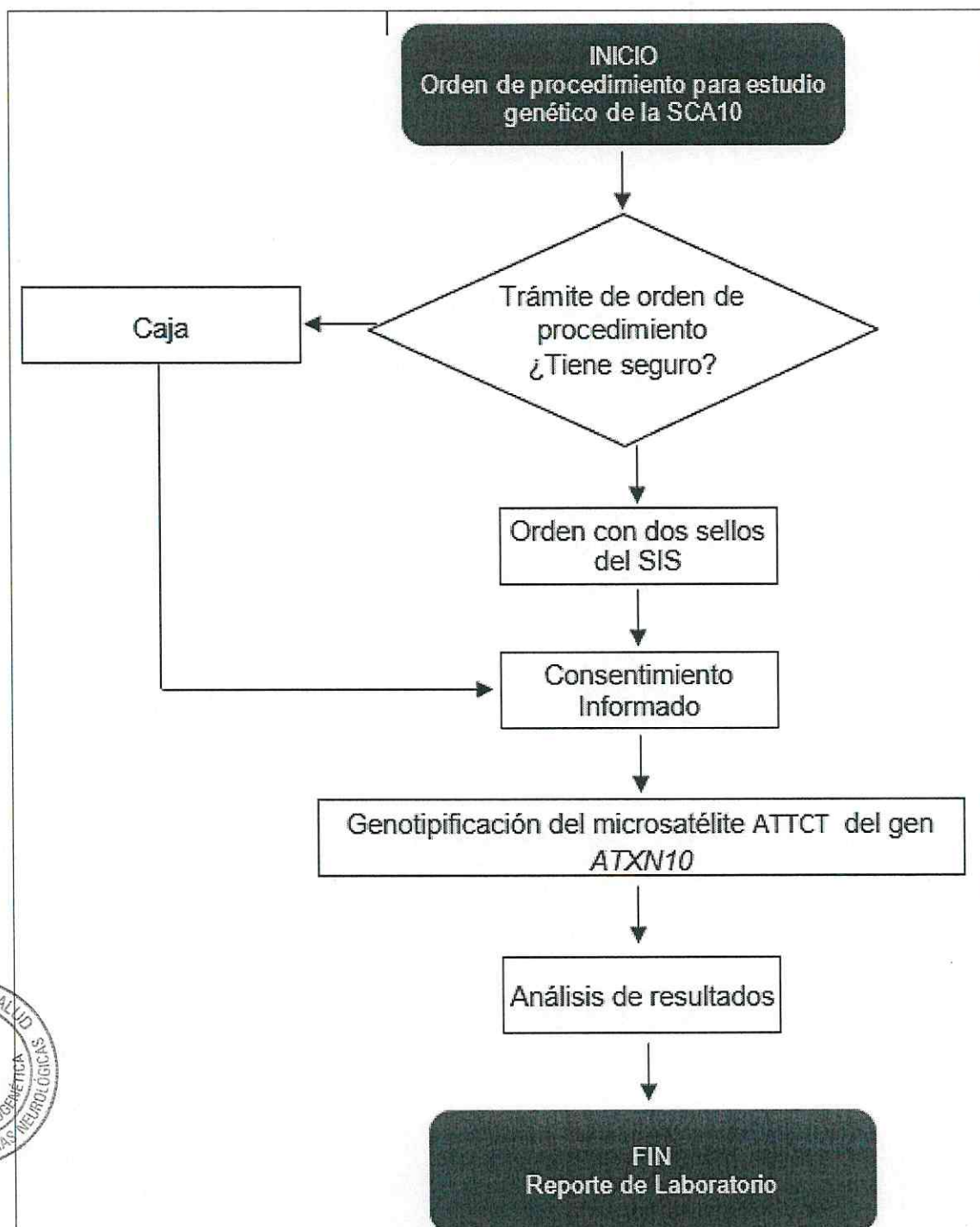


J. MEDINA



ANEXO 02

FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA ATAXIA TIPO 10





PERÚ

Ministerio
de Salud

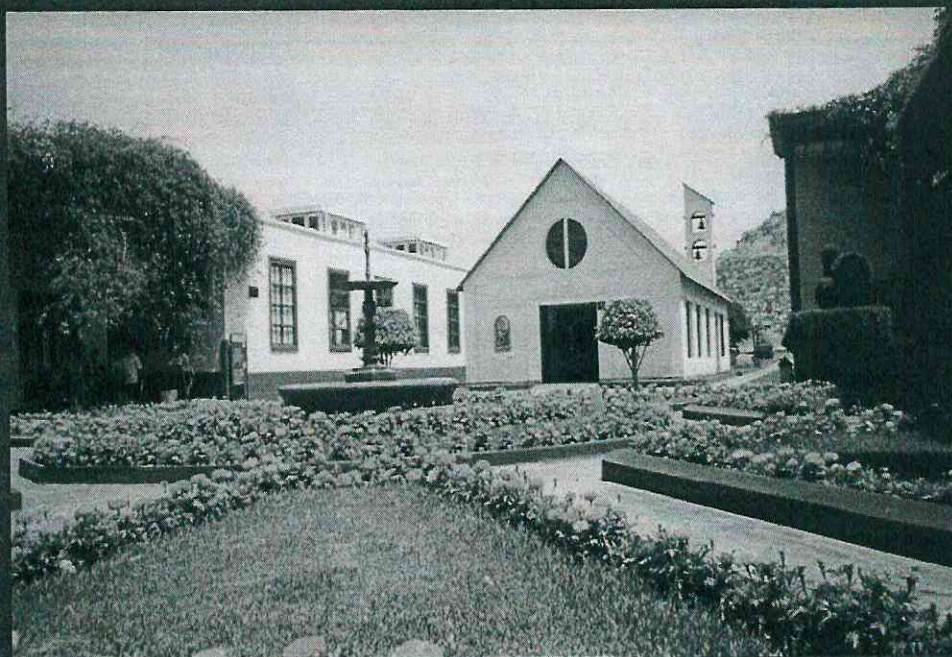
Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

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 AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN
NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUIA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DE LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 3 (SCA3)



INCN
2022





PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"



Siempre
con el pueblo



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 AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



D. TEJADA P.

GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DE LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 3 (SCA3)



PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"



Siempre
con el pueblo



DIRECTORIO:

M.C. ESP. JORGE ENRIQUE MEDINA RUBIO
DIRECTOR GENERAL

ECON. DAVID ALEJANDRO TEJADA PARDO
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO

M.C. ESP. JUAN MANUEL SIFUENTES MONGE
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN,
DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

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

M.C. ESP. ELISON H. SARAPURA CASTRO
JEFE DEL SERVICIO DE NEUROGENÉTICA

APOYO ADMINISTRATIVO:

TEC. LUIS MIGUEL CRUZADO SALAZAR
JEFE DE LA UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

BACH. DIEGO ALEXANDER FERIA ROJAS
UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO



Lima, Perú
2022





ÍNDICE

Nº	CONTENIDO	PÁG.
	CUADRO DE CONTROL	05
I.	FINALIDAD	06
II.	OBJETIVO	06
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	06
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	06
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	06
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	06
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	06
	5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS	06
	5.3.1. RECURSOS HUMANOS	06
	5.3.2. MATERIALES	07
	5.3.2.1. IMPLEMENTOS MOLECULARES	07
	5.3.2.2. REACTIVOS QUÍMICOS	07
	5.3.2.3. MATERIAL DE PLÁSTICO	07
	5.3.2.4. MATERIAL DE VIDRIO	07
	5.3.2.5. OTROS MATERIALES	08
	5.3.2.6. EQUIPOS	08
	5.3.2.7. SOFTWARE	08
	5.3.3. SERVICIOS	08
VI.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	08
VII.	RECOMENDACIONES	13
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
IX.	ANEXOS	13
	ANEXO 01: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS	14
	ANEXO 02: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA PARA SCA3	15



D. TEJADA P.



J. MEDINA



PERÚ

Ministerio
de SaludViceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en SaludInstituto Nacional
de Ciencias Neurológicas"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"Siempre
con el pueblo

GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DE LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 3 (SCA3)



ROL	ORGANO	FECHA	V° B°
ELABORADO	SERVICIO DE NEUROGENÉTICA	DICIEMBRE, 2021	
REVISADO POR	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROLOGÍA	DICIEMBRE, 2021	
	DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	DICIEMBRE, 2021	
	OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO (UNIDAD DE ORGANIZACIÓN)	ENERO, 2022	
	ASESORÍA JURÍDICA	ENERO, 2022	
APROBADO	DIRECCIÓN GENERAL	ENERO, 2022	



GUIA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DE LA ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 3 (SCA3)

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3) a través de una guía técnica para la genotipificación del número de repeticiones CAG del gen ATXN3, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CAG del gen ATXN3 con una técnica basada en PCR y TP-PCR en apoyo al diagnóstico de la ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3).

III. AMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

- 81180 - ATXN3 (ataxina 3) (p. ej., ataxia espinocerebelosa, enfermedad de Machado-Joseph) análisis de genes, evaluación para detectar alelos

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- Ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3): enfermedad neurodegenerativa causada por el microsatélite CAG anormalmente expandido en el gen ATXN3.
- Genotipificación del gen ATXN3: proceso de la determinación del genotipo de un individuo con respecto al número de repeticiones CAG en el gen ATXN3.

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- Gen ATXN3: gen ubicado en la región autosómica 14q32.12
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- TP-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con cebador de triple cebador.
- 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.
- Consentimiento Informado: Procedimiento mediante el cual se garantiza que el sujeto ha expresado voluntariamente su intención de participar en una prueba genética.
- GENOTIPIFICACION DEL MICROSATÉLITE CAG POR TP-PCR
- Este procedimiento es complementario a la PCR convencional. Se aplica en casos que resultan aparentemente homocigotos por PCR. El resultado es cualitativo, sólo determina la presencia o ausencia de un alelo mutado mayor a 60 repeticiones CAG que la PCR no pudo detectar.

5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

5.3.1. RECURSOS HUMANOS

- ✓ 01 biólogo con entrenamiento en biología molecular.
- ✓ 01 técnico de laboratorio.
- ✓ 01 médico neurogenetista.
- ✓ 01 médico genetista.



5.3.2. MATERIALES

5.3.2.1. Implementos moleculares

- ❖ Cebador MJD52 (Forward): 5' – CCA GTG ACT ACT TTG ATT CG – 3'
- ❖ Cebador MJD25 (Reverse): 5' – TGG CCT TTC ACA TGG ATG TGA A – 3'
- ❖ Cebador ForTail: 5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACG-3'
- ❖ Cebador IntRep: 5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACGCGAGCAGCAGCAGCAG-3'
- ❖ GeneAmp® dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- ❖ DMSO 100% (Sigma-Aldrich)
- ❖ Platinum® Taq DNA polymerase 5 U/μL (Invitrogen). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl₂ 50 mM.
- ❖ Marcador de peso molecular de 10 pb
- ❖ Agua ultrapura libre de nucleasa

5.3.2.2. Reactivos químicos

- ❖ Acrilamida
- ❖ Bisacrilamida
- ❖ TEMED
- ❖ Persulfato de amonio
- ❖ Trizma base
- ❖ Ácido bórico
- ❖ EDTA 0.5M pH 8
- ❖ Ácido Clorhídrico
- ❖ Xilencianol
- ❖ Azul de Bromofenol
- ❖ Glicerol
- ❖ Etanol absoluto
- ❖ Ácido acético
- ❖ Nitrato de Plata (AgNO₃)
- ❖ Hidróxido de sodio (NaOH)
- ❖ Formaldehído 37%
- ❖ Agua tridestilada

5.3.2.3. 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, 1000 μL
- ❖ Tubos de PCR 0.2 mL
- ❖ Tubos de centrifuga 1.5 mL
- ❖ Gradillas para tubos de 0.2 mL y 1.5 mL
- ❖ Pissetas
- ❖ Estación congelada para PCR
- ❖ Soporte para micropipetas

5.3.2.4. Material de vidrio

- ❖ Matraz aforado
- ❖ Probetas
- ❖ Vasos de precipitados
- ❖ Pipetas 1 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL.
- ❖ Propipetas
- ❖ Frascos



- ❖ Baguetas
- ❖ Botellas para reactivos químicos

5.3.2.5. Otros materiales

- ❖ Papel Lente
- ❖ Tiras reactivas de pH
- ❖ Mascarilla descartable (N-95 y quirúrgica)
- ❖ 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.
- ❖ Papel aluminio
- ❖ Parafilm

5.3.2.6. Equipos

- ❖ Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- ❖ Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- ❖ Cabina de PCR (ESCO®)
- ❖ Cámara de electroforesis vertical profesional (Cleaver)
- ❖ Fuente poder (Biorad)
- ❖ Balanza analítica (Shimadzu)
- ❖ Centrífuga (Eppendorf)
- ❖ Agitador magnético (Velp)
- ❖ Refrigeradores a 4°C (Thermo Scientific y Miray)
- ❖ Congeladora a -8°C/-20°C (Frigidaire)
- ❖ Picocentrífuga
- ❖ Vórtex
- ❖ Cronómetro
- ❖ Computadora de escritorio
- ❖ Impresora
- ❖ Sistema de alimentación eléctrica ininterrumpida
- ❖ Estabilizador

5.3.2.7. Software

- ❖ Gen5™ versión 2.0 (Biotek)

5.3.3. SERVICIOS

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

VI. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Este estudio requiere que se incluya un procedimiento TP-PCR para descartar casos de homoalelismo.



DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
INICIO				
1	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Médico especialista (neurogenetista, médico genetista)	Servicio de Neurogenética
2	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO Tramitar la orden en la oficina de pre liquidación para que coloquen los datos de pre liquidación Pagar Ventanilla del SIS: 2 sellos (ROJO y AZUL)	Boleta de Pago o preliquidación con VB del SIS.	Personal de Oficina de Preliquidación Personal de admisión. Ventanilla CAJA	Contabilidad SIS Contabilidad
3	CONSENTIMIENTO INFORMADO	Formato de consentimiento informado firmado	Médico especialista (neurogenetista, médico genetista)	Servicio de Neurogenética
4	<u>EXTRACCIÓN DE ADN</u> (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
5	<u>PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN</u>	Alícuota de ADN con concentración 10 ng/uL	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	<u>GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG POR PCR</u> Amplificación por PCR usando Termociclador Proflex: Preparar la siguiente mezcla de reacción para una muestra problema, una muestra control 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 10 %, 1 UI • Buffer de PCR para enzima Taq platinum 1X, 1 UI • dNTPs 0.15mM c/u, 0,6 UI • MgCl₂ 1.5mM, 0.3 UI	Genotipo para los alelos del microsatélite CAG	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética



- Mix Cebador: MJD52 + MJD25 1 uM c/u, 0.5UI
- Enzima Taq Platinum 0.05 U/uL, 0.1UI
- ADN 0.3 ng/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 58.9°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 60 segundos; seguido por un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Visualización de productos de PCR por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida no denaturante al 6%

Utilizar una cámara de 30 cm para la electroforesis y correr a 150V durante 30 minutos
Sembrar en cada pocillo 2uL de producto de PCR con 2uL de buffer de siembra.

Para Genotipar:

Prepara un gel de poliacrilamida al 6% no denaturante y correr en la cámara de 20cm.

-Preparar mezcla de marcadores de Inferencia y sembrar como se indica:

Mix de marcadores	C U G	Volu men de mues tra (uL)	Volu men de Buffer de siemb ra (uL)
Mix 1	1	7	6
	2	6	
Mix 2	3	7	6
	4	6	
Mix 3	5	6	5
	6	6	
Mix 4	7	7	6
	8	6	
Mix 5	9	6	5
	10	6	

Volumen de la muestra problema entre 2- 5 uL, dependiendo de cómo se visualice en la 1ra. corrida



D. TEJADA R.



J. MEDINA

7	Voltaje de corrida: • 300V x 20 min. • 200Vx 40 min. • 150V hasta que el Xilen Cianol se desplace a 6cm del borde de la placa de corrida. Realizar la tinción del gel con el protocolo de tinción argéntica usando solución de nitrato de plata. Estimación del número de repeticiones CAG Obtener una imagen digital del gel de poliacrilamida. Con ayuda del programa Gel analyzer determinar una curva de calibración usando los valores de genotipo de las muestras marcadoras. Para esto se selecciona en el gel las bandas correspondientes a los alelos de cada muestra. El programa calcula la curva de calibración y la ecuación de la misma en base a la distancia que cada banda (alelo) migra en el gel. El programa obtiene por análisis de regresión lineal el número de repeticiones CAG de las muestras problema. GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG POR TP-PCR En la cabina de PCR, preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra: • DMSO 6 %, 0.6 uL • Buffer de PCR para enzima Taq platinum 1X, 1 uL • dNTPs 0.2mM c/u, 0.8 uL • MgCl₂ 1.5mM, 0.3 uL • Cebador: MJD25R 0.2uM, 0,1uL For Tail 0.2 uM ,0.1 uL IntRep 0.06 uM, 0.12uL • Enzima Taq Platinum 0.04 U/uL, 0.08 uL			 J. MEDINA
---	--	--	--	---------------



- ADN 1 ng/uL, 1-2 uL
- Agua ultrapura hasta completar 10uL.

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 62°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 45 segundos; seguido por un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 10%.

Sembrar en cada pocillo 8uL de producto de PCR con 2uL de buffer de siembra.

Voltaje de corrida:

- 200V x 1:30 hora
- Correr hasta que el Xilen Cianol se desplace a 4cm del borde de la placa de corrida.

Realizar la tinción del gel con el protocolo de tinción argéntica usando solución de nitrato de plata.

Determinación del genotipo

Establecer una línea límite de normalidad a una altura correspondiente a 228 pb.

La muestra positiva mostrará un patrón de bandas en escalera que supera el límite de normalidad. En el caso de una muestra negativa este patrón no superará el límite de normalidad.

El genotipo de las muestras problemas se determinará según el patrón de bandas que presente en comparación con las muestras control.

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 SCA3

Laboratorio de Neurogenética

Servicio de Neurogenética

FIN





VII. 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.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Paulson H, Shakkottai V. Spinocerebellar Ataxia Type 3. 1998 Oct 10 [Updated 2020 Jun 4]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1196>.

IX. ANEXO

ANEXO 01: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

ANEXO 02: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA PARA SCA3





ANEXO 01

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

POLIACRILAMIDA 21%		TBE 10X	
Bis acrilamida	20 g	Tris	54 g
Acrilamida	1 g	Ácido Bórico	27.5 g
H ₂ O _{dd} hasta 100 mL		EDTA 0.5M pH 8.0	20 ml
		H ₂ O _{dd} hasta 500 mL	
POLIACRILAMIDA NO DENATURANTE AL 6% (Stock de trabajo)		TBE 1X	
Poliacrilamida 21%	6 mL	TBE 10X	100 mL
TBE 10X	2.1 mL	H ₂ O _{dd}	900 mL
H ₂ O _{dd}	11.9 mL		
POLIACRILAMIDA NO DENATURANTE AL 10% (Stock de trabajo)			
Poliacrilamida 21%	10 mL		
TBE 10X	2.1 mL		
H ₂ O _{dd}	8.9 mL		

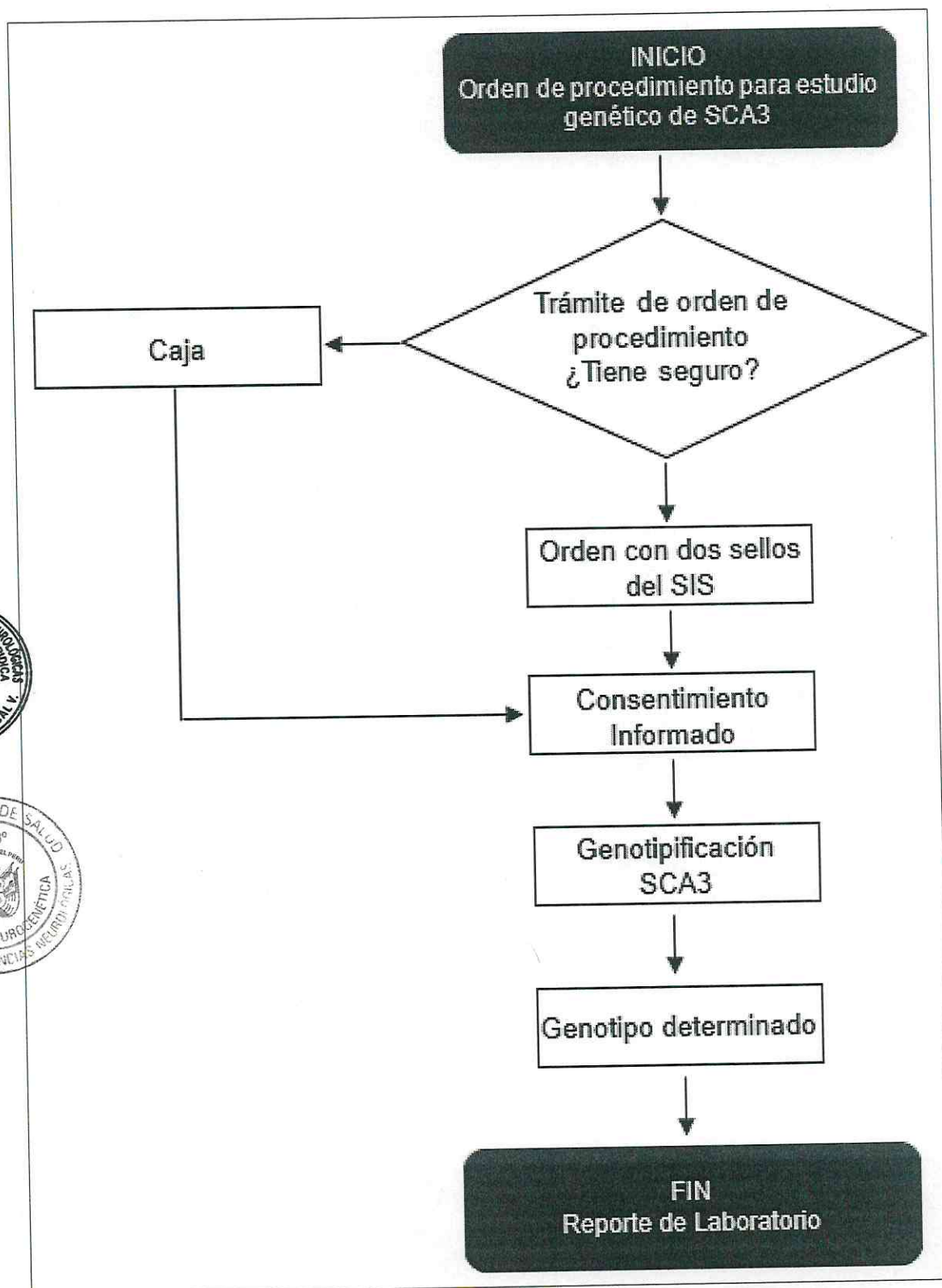
Soluciones para tinción Argéntica

SOLUCIÓN A (Fijación)		SOLUCIÓN B (Tinción)		SOLUCIÓN C (Revelado)	
Ácido acético	1 mL	Nitrato de plata	0.3 g	Hidróxido de sodio	3 g
Alcohol absoluto	10 mL	H ₂ O _{dd} hasta 150 mL		H ₂ O _{dd} hasta 150 mL	
H ₂ O _{dd} hasta 150 mL				Agregar Formaldehído al 37%	1 mL



ANEXO 02

FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA PARA SCA3





PERÚ
Ministerio
de Salud

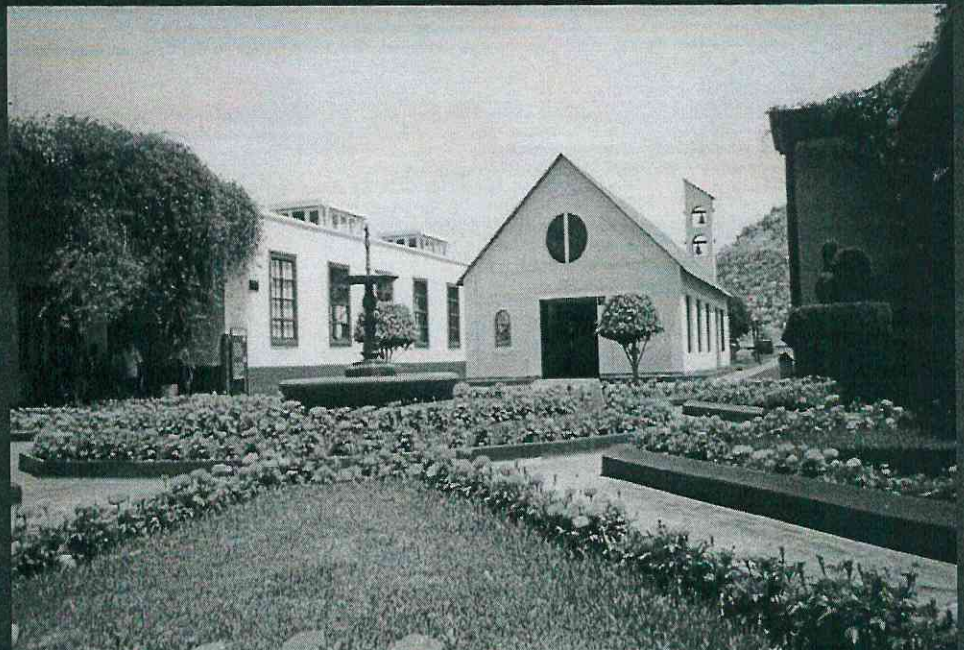
Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

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 AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



**GUIA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA
GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN ATN1**



**INCN
2022**



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



PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

Siempre
con el pueblo



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 AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN ATN1





PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

Siempre
con el pueblo



DIRECTORIO:

M.C. ESP. JORGE ENRIQUE MEDINA RUBIO
DIRECTOR GENERAL

ECON. DAVID ALEJANDRO TEJADA PARDO
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO

M.C. ESP. JUAN MANUEL SIFUENTES MONGE
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN,
DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

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

M.C. ESP. ELISON SARAPURA CASTRO
JEFE DEL SERVICIO DE NEUROGENÉTICA

APOYO ADMINISTRATIVO:

TEC. LUIS MIGUEL CRUZADO SALAZAR
JEFE DE LA UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

BACH. DIEGO ALEXANDER FERIA ROJAS
UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO



Lima, Perú
2022





PERÚ

Ministerio
de SaludViceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en SaludInstituto Nacional
de Ciencias Neurológicas"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"Siempre
con el pueblo

ÍNDICE

Nº	CONTENIDO	PÁG.
	CUADRO DE CONTROL	05
I.	FINALIDAD	06
II.	OBJETIVO	06
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	06
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	06
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	06
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	06
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	06
	5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS	06
	5.3.1. RECURSOS HUMANOS	06
	5.3.2. MATERIALES	07
	5.3.2.1. IMPLEMENTOS MOLECULARES	07
	5.3.2.2. REACTIVOS QUÍMICOS	07
	5.3.2.3. MATERIAL DE PLÁSTICO	07
	5.3.2.4. MATERIAL DE VIDRIO	08
	5.3.2.5. OTROS MATERIALES	08
	5.3.2.6. EQUIPOS	08
	5.3.2.7. SOFTWARE	09
	5.3.3. SERVICIOS	09
VI.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	09
VII.	RECOMENDACIONES	12
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
IX.	ANEXO	12
	ANEXO N° 01: FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATROFIA DENTATO-RUBRO-PALIDO-LUISIANA (DRPLA)	13



D. TEJADA P.



J. MEDINA



PERÚ

Ministerio
de SaludViceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en SaludInstituto Nacional
de Ciencias Neurológicas"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"Siempre
con el pueblo

GUIA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN ATN1



D. TEJADA P.

ROL	ORGANO	FECHA	V° B°
ELABORADO	SERVICIO DE NEUROGENÉTICA	DICIEMBRE, 2021	
REVISADO POR	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROLOGÍA	DICIEMBRE, 2021	
	DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	DICIEMBRE, 2021	
	OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO (UNIDAD DE ORGANIZACIÓN)	ENERO, 2022	
	ASESORÍA JURÍDICA	ENERO, 2022	
APROBADO	DIRECCIÓN GENERAL	ENERO, 2022	



J. MEDINA

GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN ATN1

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de la Atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, a través de una guía técnica para la genotipificación del número de repeticiones CAG del gen ATN1, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CAG del gen ATN1 en apoyo al diagnóstico de la Atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana.

III. AMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

- 81177 - ATN1 (atrofina1) (p. ej., atrofia dentorubropalidoluisiana) análisis de genes, evaluación para detectar alelos anormales (p. ej., expandidos)

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 ATN1: proceso de la determinación del genotipo de un individuo con respecto al número de repeticiones CAG en el gen ATN1.

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.
- 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) 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.

5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

5.3.1. RECURSOS HUMANOS

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



D. TEJADA P.



J. MEDINA

5.3.2. MATERIALES

5.3.2.1. Implementos moleculares

- ❖ Cebador DRPLA-F: 5'-6-FAM-CCCAGTCCACCGCCACCCACCA-3'
- ❖ Cebador DRPLA-R: 5'- TGCTCCAGGAGGAGGGGGCCAGA-3'
- ❖ dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- ❖ DMSO 100% (Sigma-Aldrich)
- ❖ Agua ultrapura libre de nucleasa
- ❖ 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
- ❖ SeqStudio™ Cathode Buffer Container

5.3.2.2. 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%
- ❖ Agua tridestilada

5.3.2.3. 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 centrifuga 2 mL
- ❖ Gradilla para tubos de 0.2 mL
- ❖ Gradilla para tubos de 2 mL
- ❖ Pissetas
- ❖ 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



5.3.2.4. 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.

5.3.2.5. 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, 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.

5.3.2.6. 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 4°C (Thermo Scientific)
- ❖ Refrigeradores a 4°C (Miray)
- ❖ Congeladora a -20°C (Miray)
- ❖ Picocentrífuga
- ❖ Vórtex
- ❖ Cronómetro
- ❖ Computadoras de escritorio
- ❖ Impresora
- ❖ Sistema de alimentación eléctrica ininterrumpida
- ❖ Estabilizador



D. TEJADA P.



J. MEDINA

5.3.2.7. Software

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

5.3.3. SERVICIOS

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

VI. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

DESCRIPCION DEL PROCEDIMIENTO				
Nº	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 <i>Preliquidación</i> Solicitar la preliquidación del procedimiento <i>Liquidación</i> Liquidar el costo del procedimiento o Trámite de aprobación del SIS	Sello de Preliquidación Boleta de Pago Orden con dos sellos de SIS	Unidad 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:	Genotipo para los alelos del microsatélite CAG	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética



**Amplificación del microsatélite CAG del gen ATN1**

En la cabina de PCR, preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra:

- DMSO 10%
- Buffer de PCR para enzima taq platinum 1X
- dNTPs 0.2mM c/u
- $MgCl_2$ 1.5 mM
- Cebador DRPLA-F 0.5uM
- Cebador DRPLA-R 0.5uM
- Enzima taq platinum 0.05 U/uL
- ADN 1 ng/uL

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 30 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 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 muestras 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 9.35 μ L de Formamida 0.15 μ L Marcador GeneScanTM 500 LIZ, por cada muestra, control y muestra blanco a evaluarse. Dispensar 9.5 μ L de la mezcla en cada pocillo de la placa. Añadir 0.5 μ L 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.



D. TEJADA P.



Electroforesis capilar usando Analizador genético SeqStudio™
Una vez preparada la placa, 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 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 GeneScan™ 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 electroferograma obtenido empleando el estándar de secuencia específica para este procedimiento y los electroferogramas obtenidos por cada muestra analizada.

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 DRPLA

Laboratorio de Neurogenética (biólogo genetista y médico genetista)

Servicio de Neurogenética

FIN



VII. 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.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sulek-Piatkowska A, et al. 2008. Searching for mutation in the JPH3, ATN1 and TBP genes in Polish patients suspected of Huntington's disease and without mutation in the IT15 gene. Neurol Neurochir Pol. 42(3):203-9.

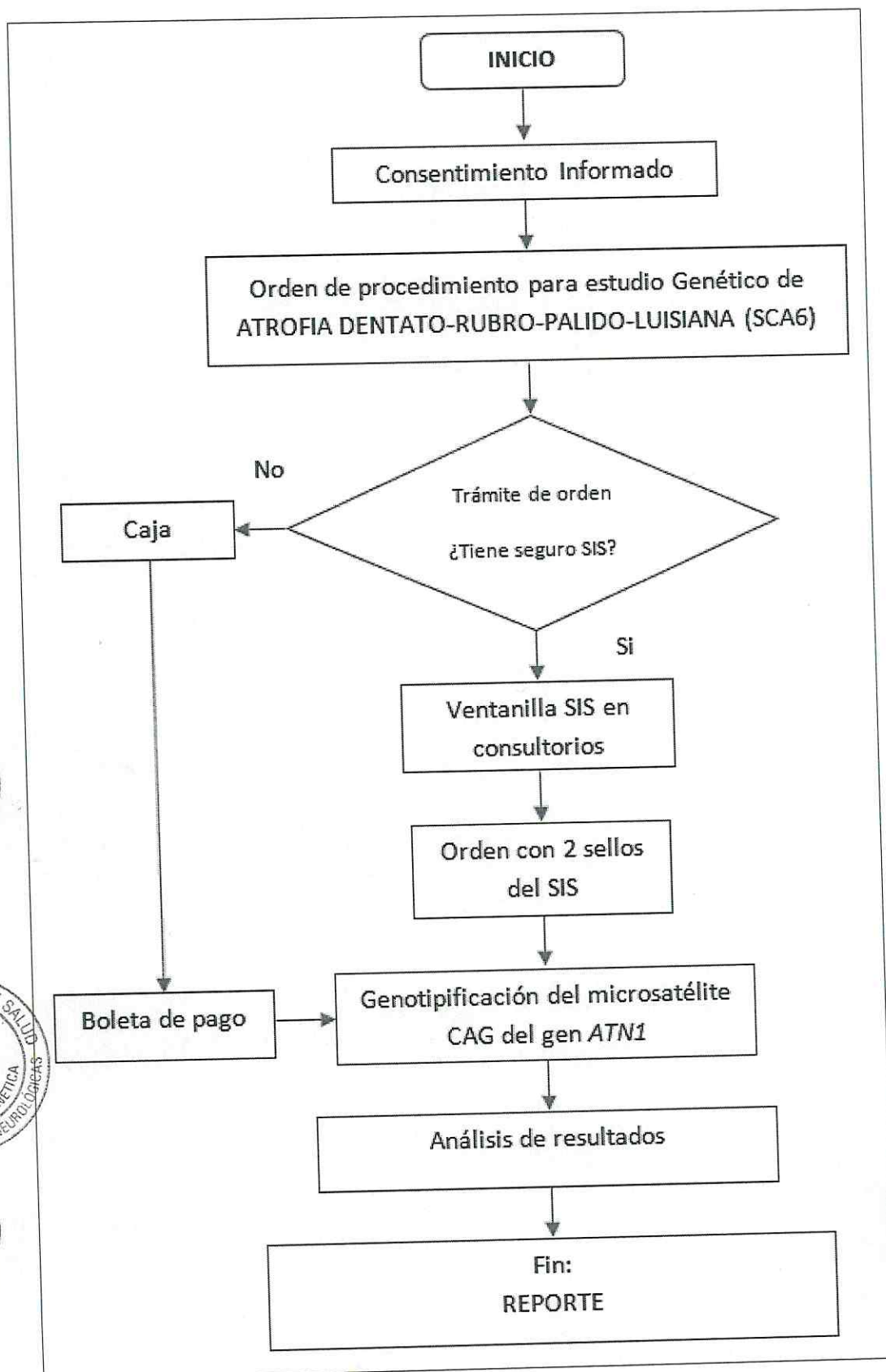
IX. ANEXO

ANEXO 01: FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATROFIA DENTATO-RUBRO-PALIDO-LUISIANA (DRPLA)



ANEXO 01

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA LA ATROFIA DENTATO-RUBRO-PALIDO-LUISIANA (DRPLA)





PERÚ

Ministerio
de Salud

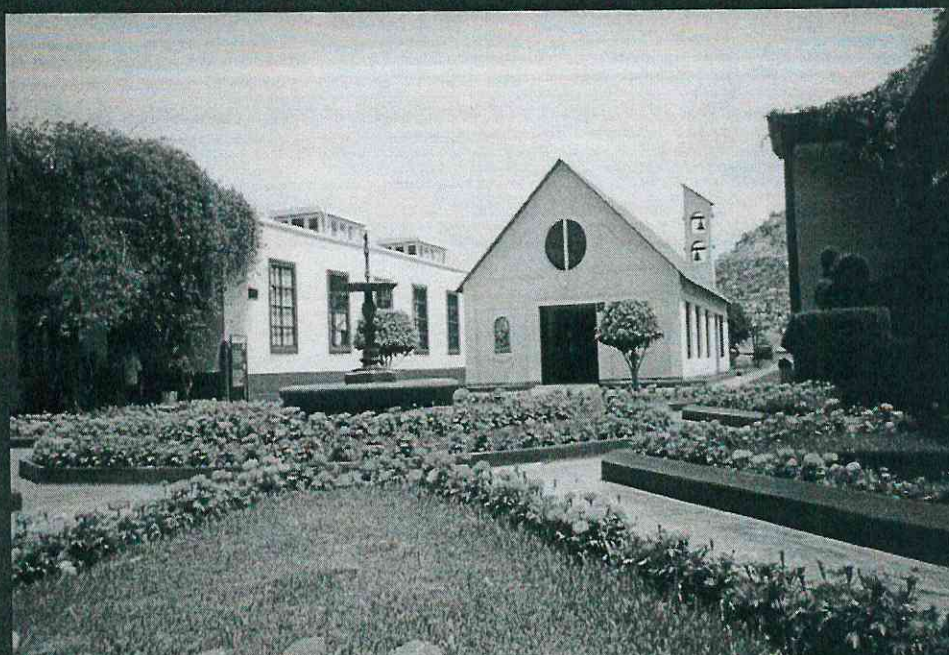
Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

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 AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN PPP2R2B



INCN
2022



PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

Siempre
con el pueblo



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 AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN PPP2R2B





PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

Siempre
con el pueblo



DIRECTORIO:

M.C. ESP. JORGE ENRIQUE MEDINA RUBIO
DIRECTOR GENERAL

ECON. DAVID ALEJANDRO TEJADA PARDO
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO

M.C. ESP. JUAN MANUEL SIFUENTES MONGE
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN,
DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

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

M.C. ESP. ELISON SARAPURA CASTRO
JEFE DEL SERVICIO DE NEUROGENÉTICA

APOYO ADMINISTRATIVO:

TEC. LUIS MIGUEL CRUZADO SALAZAR
JEFE DE LA UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

BACH. DIEGO ALEXANDER FERIA ROJAS
UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO



Lima, Perú
2022





PERÚ

Ministerio
de SaludViceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en SaludInstituto Nacional
de Ciencias Neurológicas"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"Siempre
con el pueblo

ÍNDICE

N°	CONTENIDO	PÁG.
	CUADRO DE CONTROL	05
I.	FINALIDAD	06
II.	OBJETIVO	06
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	06
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	06
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	06
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	06
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	06
	5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS	06
	5.3.1. RECURSOS HUMANOS	06
	5.3.2. MATERIALES	06
	5.3.2.1. IMPLEMENTOS MOLECULARES	06
	5.3.2.2. REACTIVOS QUÍMICOS	07
	5.3.2.3. MATERIAL DE PLÁSTICO	07
	5.3.2.4. MATERIAL DE VIDRIO	07
	5.3.2.5. OTROS MATERIALES	07
	5.3.2.6. EQUIPOS	08
	5.3.2.7. SOFTWARE	08
	5.3.3. SERVICIOS	08
VI.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	08
VII.	RECOMENDACIONES	11
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
IX.	ANEXOS	11
	ANEXO N° 01: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS	12
	ANEXO N° 02: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA SCA12	13



D. TEJADA P.



VºBº

ABOG. C. BERROCAL V.



J. MEDINA

GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN PPP2R2B

ROL	ORGANO	FECHA	V° B°
ELABORADO	SERVICIO DE NEUROGENÉTICA	DICIEMBRE, 2021	
	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA	DICIEMBRE, 2021	
REVISADO POR	DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	DICIEMBRE, 2021	
	OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO (UNIDAD DE ORGANIZACIÓN)	ENERO, 2022	
	ASESORÍA JURÍDICA	ENERO, 2022	
APROBADO	DIRECCIÓN GENERAL	ENERO, 2022	



D. TEJADA P.



J. MEDINA



GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG DEL GEN PPP2R2B

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 12 (SCA12) a través de una guía técnica para la genotipificación del número de repeticiones del trinucleótido CAG, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CAG del gen PPP2R2B con una técnica basada en PCR, en apoyo al diagnóstico de la ataxia espinocerebelosa tipo 12 (SCA12).

III. AMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

- 81343 - PPP2R2B (proteína fosfatasa 2 subunidad reguladora beta) (p. ej., ataxia espinocerebelosa) análisis de genes, evaluación para detectar alelos anormales (p. ej., expandidos)

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- Ataxia espinocerebelosa tipo 12 (SCA12): enfermedad neurodegenerativa causada por el microsatélite CAG anormalmente expandido en el gen PPP2R2B
- Genotipificación del gen PPP2R2B: proceso de la determinación del genotipo de un individuo con respecto al número de repeticiones CAG en el gen PPP2R2B.

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- Gen PPP2R2B: gen ubicado en el cromosoma 5q32
- 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) específico de un individuo.
- ADN: ácido Desoxirribonucleico.

5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

5.3.1. RECURSOS HUMANOS

- ✓ 01 biólogo con entrenamiento en biología molecular.
- ✓ 01 técnico de laboratorio.
- ✓ 01 médico neurogenetista.
- ✓ 01 médico genetista.

5.3.2. MATERIALES

5.3.2.1. Implementos moleculares

Secuencias de cebadores de PCR:

- ❖ Cebador SCA12F: (IRD-700-5'- TGCTGGGAAAGAGTCGTG- 3')
- ❖ Cebador SCA12R: (5'- CAGCGCACTCACCCTCAG- 3')



- ❖ GeneAmp® dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- ❖ Platinum® Taq DNA polymerase 5 U/μL (Invitrogen). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl₂ 50 mM.
- ❖ GeneScan™ 500 LIZ™
- ❖ Agua ultrapura libre de nucleasas

5.3.2.2. Reactivos químicos

- ❖ Acrilamida
- ❖ Bisacrilamida
- ❖ TEMED
- ❖ Persulfato de amonio
- ❖ Tris
- ❖ Ácido bórico
- ❖ EDTA 0.5M pH 8
- ❖ Ácido Clorhídrico
- ❖ Xilencianol
- ❖ Azul de Bromofenol
- ❖ Glicerol
- ❖ Etanol absoluto
- ❖ Ácido acético
- ❖ Nitrato de Plata (AgNO₃)
- ❖ Hidróxido de sodio (NaOH)
- ❖ Formaldehído 37%
- ❖ Agua tridestilada

5.3.2.3. 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, 1000 μL
- ❖ Tubos de PCR 0.2 mL
- ❖ Tubos de centrifuga 1.5 mL
- ❖ Gradillas para tubos de 0.2 mL y 1.5 mL
- ❖ Pissetas
- ❖ Estación congelada para PCR
- ❖ Soporte para micropipetas

5.3.2.4. Material de vidrio

- ❖ Matraz aforado
- ❖ Probetas
- ❖ Vasos de precipitados
- ❖ Pipetas 1 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL.
- ❖ Propipetas
- ❖ Frascos
- ❖ Baguetas
- ❖ Botellas para reactivos químicos

5.3.2.5. Otros materiales

- ❖ Papel Lente
- ❖ Tiras reactivas de pH
- ❖ Mascarilla descartable (N-95 y quirúrgica)
- ❖ 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.
- ❖ Papel aluminio
- ❖ Parafilm

5.3.2.6. Equipos

- ❖ Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- ❖ Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- ❖ Cabina de PCR (ESCO®)
- ❖ Cámara de electroforesis vertical profesional (Cleaver)
- ❖ Fuente poder (Biorad)
- ❖ Balanza analítica (Shimadzu)
- ❖ Centrífuga (Eppendorf)
- ❖ Agitador magnético (Velp)
- ❖ Refrigeradores a 4°C (Thermo Scientific y Miray)
- ❖ Congeladora a 8°C/-20°C (Frigidaire)
- ❖ Picocentrífuga
- ❖ Vórtex
- ❖ Cronómetro
- ❖ Computadora de escritorio
- ❖ Impresora
- ❖ Sistema de alimentación eléctrica ininterrumpida
- ❖ Estabilizador

5.3.2.7. Software

- ❖ Gen5™ versión 2.0 (Biotek)

5.3.3. SERVICIOS

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

VI. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO				
Nº	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
INICIO				
1	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Médico especialista (neurogenetista, médico genetista)	Servicio de Neurogenética
2	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO Tramitar la orden en la oficina de pre liquidación para que coloquen los datos de pre liquidación Pagar Ventanilla del SIS: 2 sellos (ROJO y AZUL)	Boleta de Pago o Preliquidación con VB del SIS.	Personal de Oficina de Preliquidación Personal de admisión. Ventanilla CAJA	Contabilidad SIS Contabilidad



3	CONSENTIMIENTO INFORMADO	Formato de consentimiento informado firmado	Personal de área de Toma de Muestra	Servicio de Neurogenética
4	<u>EXTRACCIÓN DE ADN</u> (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
5	<u>PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN</u>	Alícuota de ADN con 40 ng	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	<u>GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG POR PCR</u> Amplificación por PCR usando Termociclador Proflex: Preparar la siguiente mezcla de reacción para una muestra problema, una muestra control y una muestra blanco: En la cabina de PCR, preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra: • Buffer de PCR para enzima Taq platinum 1X, 1 U/uL • dNTPs 0.2mM c/u, 0,8 uL • MgCl₂ 1.5mM, 0.3 uL • Mix Cebador: 1pM de SCA12F + 10pM de SCA12R • Enzima Taq Platinum 0.04 U/uL, 0.1uL • ADN 0.5ng/uL • Completar con agua hasta 10ul Emplear el siguiente programa de amplificación: 2 minutos de denaturación inicial a 94°C, 33 ciclos de denaturación a 95°C por 45 segundos, hibridación a 60°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 45 segundos; seguido por un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos. Visualización de productos de PCR por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida no denaturante al 6% Para solo visualizar el producto del PCR, Utilizar una cámara de 10 cm para la electroforesis y correr a 150V durante 75 minutos Sembrar en cada pocillo 2uL de producto de PCR con 2uL de buffer de siembra.		Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética



D. TEJADA P.



J. MEDINA

**Preparación de placa de fragmentos:**

En una placa compatible con el equipo proceder con los siguientes pasos:
Preparar una mezcla de 9.35 μ L de Formamida, 0.15 μ L Marcador GeneScanTM 500 LIZ, por cada muestra, control y muestra blanco a evaluarse.
Dispensar 9.5 μ L de la mezcla en cada pocillo de la placa.
Añadir 0.5 μ L del producto de amplificación obtenido en las reacción de PCR.
Denaturalizar las muestras a 98°C por 5 minutos.
Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador (periodos < a 24 horas) o a -20°C (periodos > 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 CAG

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 electroferograma obtenido empleando el estándar de secuencia específica para este procedimiento y los electroferogramas obtenidos por cada muestra analizada			
7	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 SCA12	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
FIN				

VII. 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.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cholfín JA, Sobrido M, Perlman S, Pulst SM, Geschwind DH. The SCA12 Mutation as a Rare Cause of Spinocerebellar Ataxia. *Arch Neurol*. 2001;58 (11):1833–1835. doi:10.1001/archneur.58.11.1833
- Bird TD. Hereditary Ataxia Overview. 1998 Oct 28 [Updated 2019 Jul 25]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/>

IX. ANEXOS

ANEXO 01: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELETROFORESIS

ANEXO 02: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA SCA12





ANEXO 01

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELETROFORESIS

POLIACRILAMIDA 21%		TBE 10X	
Bis acrilamida	20 g	Tris	54 g
Acrilamida	1 g	Ácido Bórico	27.5 g
H ₂ O _{dd} hasta 100 mL		EDTA 0.5M pH 8.0	20 ml
		H ₂ O _{dd} hasta 500 mL	
POLIACRILAMIDA NO DENATURANTE AL 6% (Stock de trabajo)		TBE 1X	
Poliacrilamida 21%	6 mL	TBE 10X	100 mL
TBE 10X	2.1 mL	H ₂ O _{dd}	900 mL
H ₂ O _{dd}	11.9 mL		
POLIACRILAMIDA NO DENATURANTE AL 8% (Stock de trabajo)			
Poliacrilamida 21%	8 mL		
TBE 10X	2.1 mL		
H ₂ O _{dd}	11.9 mL		



TINCIÓN ARGENTICA

SOLUCIÓN A (Fijación)		SOLUCIÓN B (Tinción)		SOLUCIÓN C (Revelado)	
Ácido acético	1 mL	Nitrato de plata	0.3 g	Hidróxido de sodio	3 g
Alcohol absoluto	10 mL	H ₂ O _{dd} hasta 150 mL		H ₂ O _{dd} hasta 150 mL	
H ₂ O _{dd} hasta 150 mL				Agregar Formaldehído al 37%	1 mL



D. TEJADA

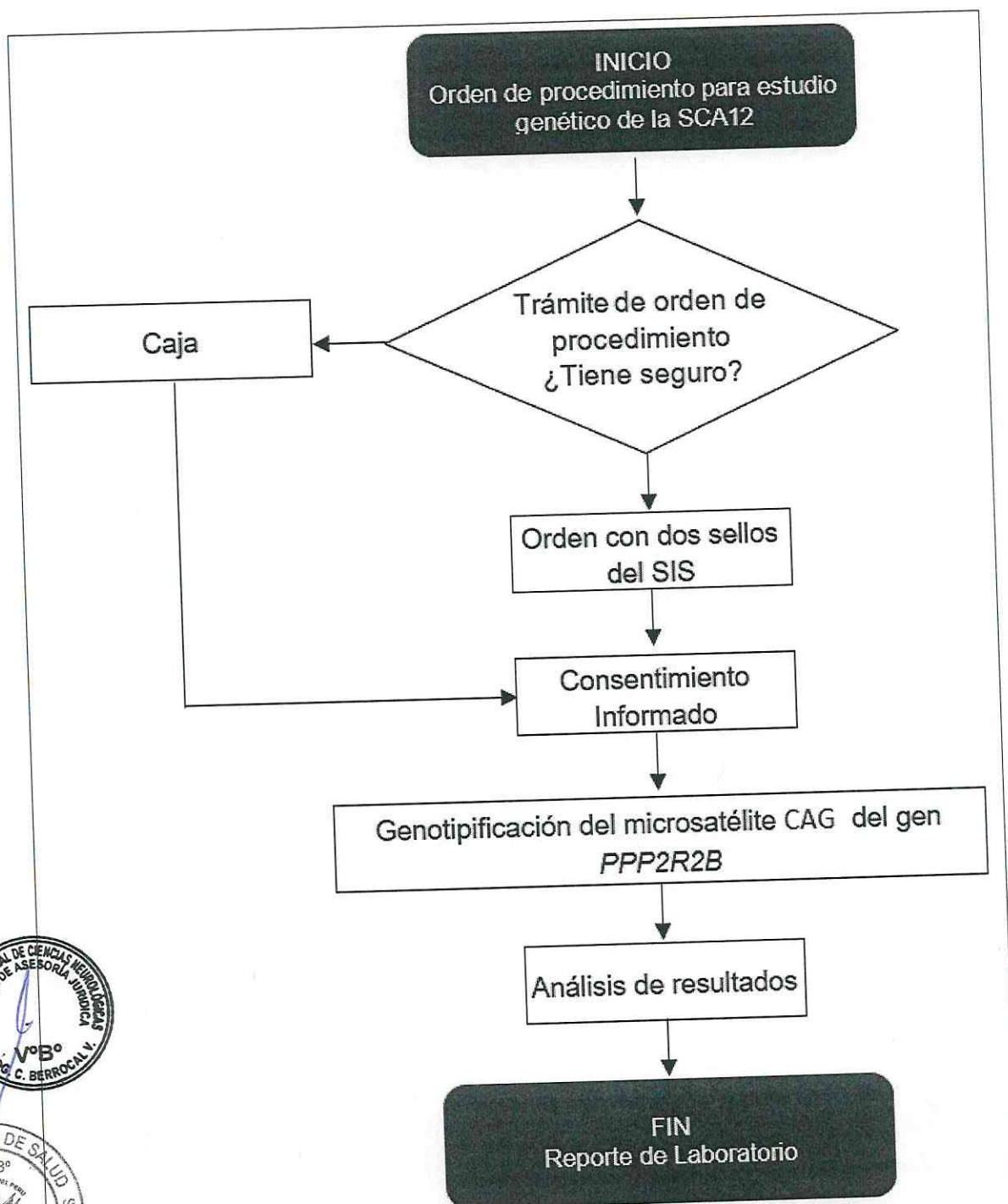


J. MEDINA



ANEXO 02

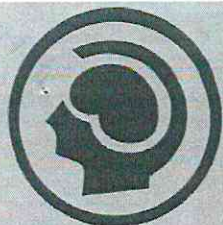
FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA SCA12



D. TEJADA P.



J. MEDINA



PERÚ

Ministerio
de Salud

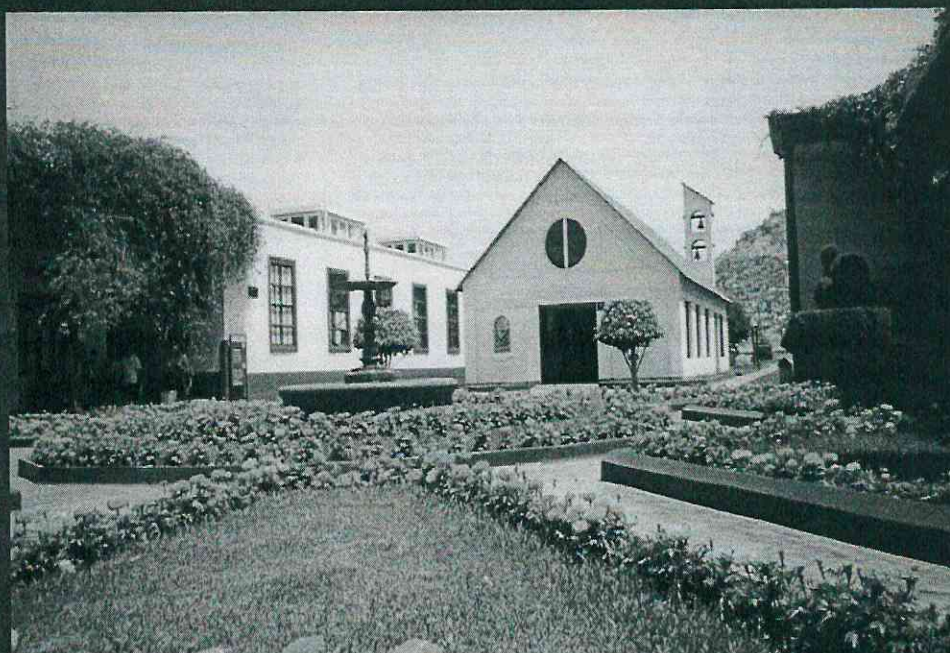
Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

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 AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN
NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUIA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG/CAA DEL GEN TBP



INCN
2022

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



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 AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG/CAA DEL GEN TBP



D. TEJADA P.



J. MEDINA

DIRECTORIO:

M.C. ESP. JORGE ENRIQUE MEDINA RUBIO
DIRECTOR GENERAL

ECON. DAVID ALEJANDRO TEJADA PARDO
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO

M.C. ESP. JUAN MANUEL SIFUENTES MONGE
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN,
DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

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

M.C. ESP. ELISON H. SARAPURA CASTRO
JEFE DEL SERVICIO DE NEUROGENÉTICA

APOYO ADMINISTRATIVO:

TEC. LUIS MIGUEL CRUZADO SALAZAR
JEFE DE LA UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

BACH. DIEGO ALEXANDER FERIA ROJAS
UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO

Lima, Perú
2022



D. TEJADA P.



J. MEDINA

ÍNDICE

N°	CONTENIDO	PÁG.
	CUADRO DE CONTROL	05
I.	FINALIDAD	06
II.	OBJETIVO	06
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	06
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	06
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	06
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	06
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	06
	5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS	06
	5.3.1. RECURSOS HUMANOS	06
	5.3.2. MATERIALES	06
	5.3.2.1. IMPLEMENTOS MOLECULARES	06
	5.3.2.2. REACTIVOS QUÍMICOS	07
	5.3.2.3. MATERIAL DE PLÁSTICO	07
	5.3.2.4. MATERIAL DE VIDRIO	07
	5.3.2.5. OTROS MATERIALES	07
	5.3.2.6. EQUIPOS	08
	5.3.2.7. SOFTWARE	08
	5.3.3. SERVICIOS	08
VI.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	08
VII.	RECOMENDACIONES	11
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
IX.	ANEXOS	11
	ANEXO N° 01: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFERESIS	12
	ANEXO N° 01: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA PARA SCA17	13



D. TEJADA R.



PERÚ

Ministerio
de SaludViceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en SaludInstituto Nacional
de Ciencias Neurológicas"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"Siempre
con el pueblo

GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG/CAA DEL GEN TBP



ROL	ORGANO	FECHA	Vº Bº
ELABORADO	SERVICIO DE NEUROGENÉTICA	DICIEMBRE, 2021	
REVISADO POR	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA	DICIEMBRE, 2021	
	DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	DICIEMBRE, 2021	
	OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO (UNIDAD DE ORGANIZACIÓN)	ENERO, 2022	
	ASESORÍA JURÍDICA	ENERO, 2022	
APROBADO	DIRECCIÓN GENERAL	ENERO, 2022	



GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG/CAA DEL GEN TBP

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17) a través de una guía técnica para la genotipificación del número de repeticiones CAG/CAA del gen TBP, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CAG/CAA del gen TBP con una técnica basada en PCR en apoyo al diagnóstico de la ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17).

III. AMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

- 81344 - TBP (proteína de unión a caja TATA) (p. ej., ataxia espinocerebelosa) análisis de genes, evaluación para detectar anomalías (p. ej., expandidos)

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- Ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17): enfermedad neurodegenerativa causada por el microsatélite CAG/CAA anormalmente expandido en el gen TBP.
- Genotipificación del gen TBP: proceso de la determinación del genotipo de un individuo con respecto al número de repeticiones CAG/CAA en el gen TBP.

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- Gen TBP: gen ubicado en el cromosoma 6q27
- 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) específico de un individuo.
- ADN: ácido Desoxirribonucleico.

5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

5.3.1. RECURSOS HUMANOS

- ✓ 01 biólogo con entrenamiento en biología molecular.
- ✓ 01 técnico de laboratorio.
- ✓ 01 médico neurogenetista.
- ✓ 01 médico genetista.

5.3.2. MATERIALES

5.3.2.1. Implementos moleculares

- ❖ Cebador 1: SCA17 F (6FAM- 5'GACCCACAGCCTATTCAGA- 3')
- ❖ Cebador 2 : SCA17R (5'-GGGACGTTGACTGCTGAAC-3')
- ❖ GeneAmp® dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- ❖ Platinum® Taq DNA polymerase 5 U/μL (Invitrogen). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl₂ 50 mM.
- ❖ Marcador de peso molecular de 10 pb
- ❖ Agua ultrapura libre de nucleasa



5.3.2.2. Reactivos químicos

- ❖ Acrilamida
- ❖ Bisacrilamida
- ❖ TEMED
- ❖ Persulfato de amonio
- ❖ Trizma base
- ❖ Ácido bórico
- ❖ EDTA 0.5M pH 8
- ❖ Ácido Clorhídrico
- ❖ Xilencianol
- ❖ Azul de Bromofenol
- ❖ Glicerol
- ❖ Etanol absoluto
- ❖ Ácido acético
- ❖ Nitrato de Plata (AgNO_3)
- ❖ Hidróxido de sodio (NaOH)
- ❖ Formaldehído 37%
- ❖ Agua tridestilada

5.3.2.3. 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 , 1000 μL
- ❖ Tubos de PCR 0.2 mL
- ❖ Tubos de centrifuga 1.5 mL
- ❖ Gradillas para tubos de 0.2 mL y 1.5 mL
- ❖ Pissetas
- ❖ Estación congelada para PCR
- ❖ Soporte para micropipetas

5.3.2.4. Material de vidrio

- ❖ Matraz aforado
- ❖ Probetas
- ❖ Vasos de precipitados
- ❖ Pipetas 1 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL.
- ❖ Propipetas
- ❖ Frascos
- ❖ Baguetas
- ❖ Botellas para reactivos químicos

5.3.2.5. Otros materiales

- ❖ Papel Lente
- ❖ Tiras reactivas de pH
- ❖ Mascarilla descartable (N-95 y quirúrgica)
- ❖ 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.
- ❖ Papel aluminio
- ❖ Parafilm



5.3.2.6. Equipos

- ❖ Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- ❖ Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- ❖ Cabina de PCR (ESCO®)
- ❖ Cámara de electroforesis vertical profesional (Cleaver)
- ❖ Fuente poder (Biorad)
- ❖ Balanza analítica (Shimadzu)
- ❖ Centrífuga (Eppendorf)
- ❖ Agitador magnético (Velp)
- ❖ Refrigeradores a 4°C (Thermo Scientific y Miray)
- ❖ Congeladora a -8°C/-20°C (Frigidaire)
- ❖ Picocentrífuga
- ❖ Vórtex
- ❖ Cronómetro
- ❖ Computadora de escritorio
- ❖ Impresora
- ❖ Sistema de alimentación eléctrica ininterrumpida
- ❖ Estabilizador

5.3.2.7. Software

- ❖ Gen5™ versión 2.0 (Biotek)

5.3.3. SERVICIOS

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

VI.

CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO				
N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
INICIO				
1	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Médico especialista (neurogenetista, médico genetista)	Servicio de Neurogenética
2	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO Tramitar la orden en la oficina de pre liquidación para que coloquen los datos de pre liquidación Pagar Ventanilla del SIS: 2 sellos (ROJO y AZUL)	Boleta de Pago o preliquidación con VB del SIS.	Personal de Oficina de Preliquidación Personal de admisión. Ventanilla CAJA	Contabilidad SIS Contabilidad
3	CONSENTIMIENTO INFORMADO	Formato de consentimiento informado firmado	Médico especialista (neurogenetista, médico genetista)	Servicio de Neurogenética





4	<u>EXTRACCIÓN DE ADN</u> (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
5	<u>PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN</u>	Alícuota de ADN con concentración 10 ng/uL	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	<u>GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG/CAA POR PCR</u> Amplificación por PCR usando Termociclador Proflex: Preparar la siguiente mezcla de reacción para una muestra problema, una muestra control y una muestra blanco: En la cabina de PCR, preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra: • Buffer de PCR para enzima Taq platinum 1X, 1 UI • dNTPs 0.2mM c/u, 0,6 UI • MgCl₂ 1.5mM, 0.3 UI • Mix Cebador: SCA17 F + SCA17 R, 1 uM c/u, 0.5UI • Enzima Taq Platinum 0.05 U/uL, 0.1UI • ADN 10 ng/uL Emplear el siguiente programa de amplificación: 2 minutos de denaturación inicial a 94°C, 40 ciclos de denaturación a 95°C por 1 minuto, hibridación a 60°C por 1 minuto, y extensión a 72°C por 60 segundos; seguido por un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos. Visualización de productos de PCR por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida no denaturante al 6% correr a 150V durante 30 minutos Sembrar en cada pocillo 2uL de producto de PCR con 2uL de buffer de siembra.	Genotipo para los alelos del microsatélite CAG/CAA	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética



**Preparación de placa de fragmentos:**

En una placa compatible con el equipo proceder con los siguientes pasos:
Preparar una mezcla de 9.35 μ L de Formamida, 0.15 μ L Marcador GeneScan™ 500 LIZ, por cada muestra, control y muestra blanco a evaluarse.
Dispensar 9.5 μ L de la mezcla en cada pocillo de la placa.
Añadir 0.5 μ L del producto de amplificación obtenido en las reacción 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 GeneScan™ 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.



	Para calcular el número de repeticiones de un alelo desconocido, se debe comparar el electroferograma obtenido empleando el estándar de secuencia específica para este procedimiento y los electroferogramas obtenidos por cada muestra analizada.			
8	REGISTRO Y REPORTE DE PROCEDIMIENTO Registrar "Reporte de laboratorio a disposición" en base de datos "Genotipificaciones".		Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
FIN				

VII. 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.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Oda M, Maruyama H, Komure O, Morino H, Terasawa H, Izumi Y, Imamura T, Yasuda M, Ichikawa K, Ogawa M, Matsumoto M, Kawakami H. Possible reduced penetrance of expansion of 44 to 47 CAG/CAA repeats in the TATA-binding protein gene in spinocerebellar ataxia type 17. Arch Neurol. 2004 Feb;61(2):209-12.
- Toyoshima Y, Onodera O, Yamada M, et al. Spinocerebellar Ataxia Type 17. 2005 Mar 29 [Updated 2019 Sep 12]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1438/>



IX. ANEXO

ANEXO 01: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

ANEXO 02: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA PARA SCA17



D. TEJADA P.



J. MEDINA



PERÚ

Ministerio
de SaludViceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en SaludInstituto Nacional
de Ciencias Neurológicas"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"Siempre
con el pueblo

ANEXO 01

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELETROFORESIS

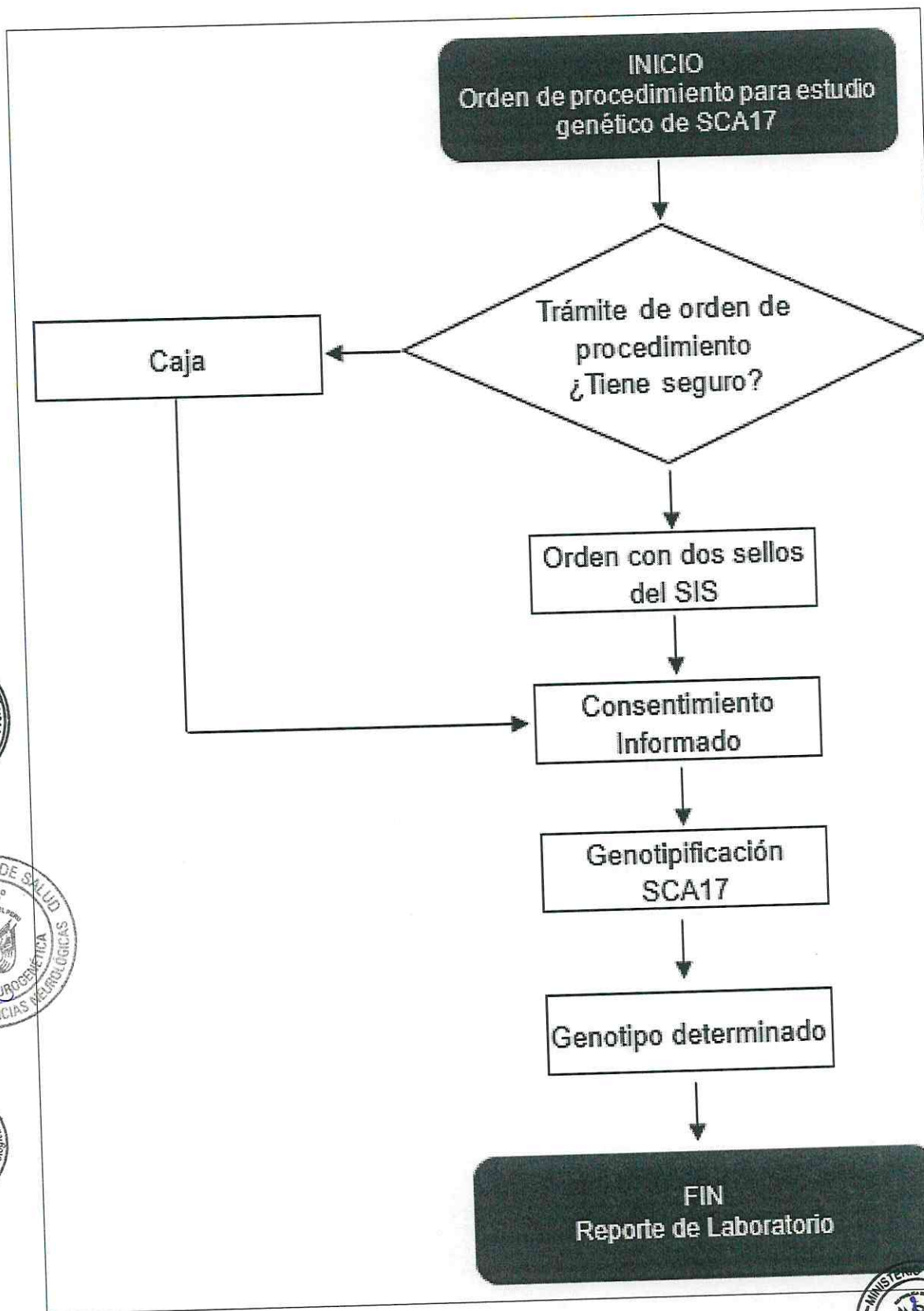
POLIACRILAMIDA 21%		TBE 10X	
Bis acrilamida	20 g	Tris	54 g
Acrilamida	1 g	Ácido Bórico	27.5 g
H ₂ O _{dd} hasta 100 mL		EDTA 0.5M pH 8.0	20 ml
		H ₂ O _{dd} hasta 500 mL	
POLIACRILAMIDA NO DENATURANTE AL 6% (Stock de trabajo)		TBE 1X	
Poliacrilamida 21%	6 mL	TBE 10X	100 mL
TBE 10X	2.1 mL	H ₂ O _{dd}	900 mL
H ₂ O _{dd}	11.9 mL		
POLIACRILAMIDA NO DENATURANTE AL 10% (Stock de trabajo)			
Poliacrilamida 21%	10 mL		
TBE 10X	2.1 mL		
H ₂ O _{dd}	8.9 mL		

Soluciones para tinción Argéntica

SOLUCIÓN A (Fijación)		SOLUCIÓN B (Tinción)		SOLUCIÓN C (Revelado)	
Ácido acético	1 mL	Nitrato de plata	0.3 g	Hidróxido de sodio	3 g
Alcohol absoluto	10 mL	H ₂ O _{dd} hasta 150 mL		H ₂ O _{dd} hasta 150 mL	
H ₂ O _{dd} hasta 150 mL				Agregar Formaldehído al 37%	1 mL



ANEXO 02 FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA PARA SCA17





PERÚ

Ministerio
de Salud

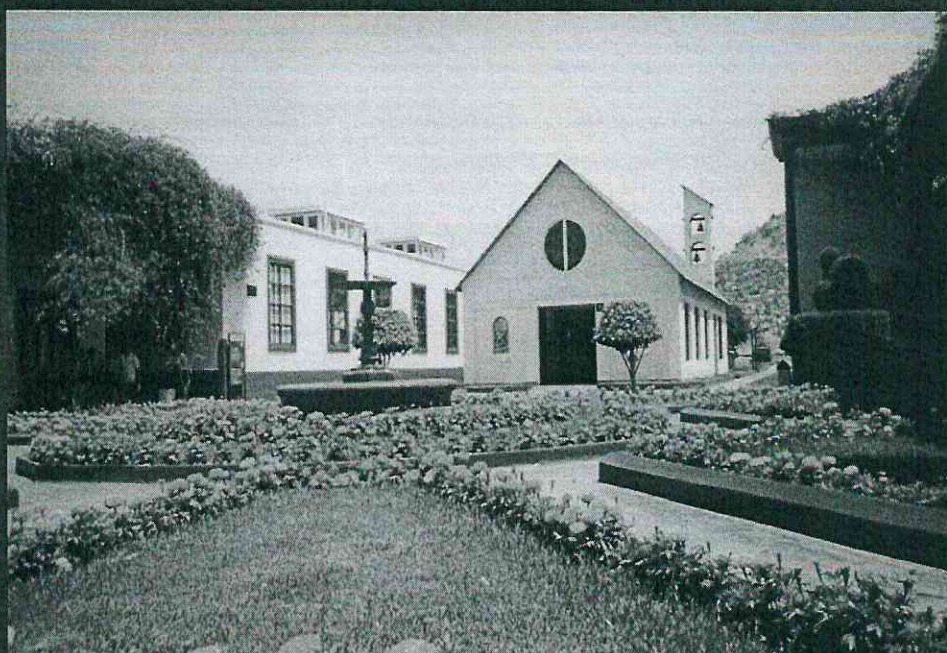
Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

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 AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN
NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUIA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA PARA ENCEFALOPATÍA MITOCONDRIAL CON ACIDOSIS LÁCTICA Y EPISODIOS TIPO ACV (MELAS)



INCN
2022





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 AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA PARA ENCEFALOPATÍA MITOCONDRIAL CON ACIDOSIS LÁCTICA Y EPISODIOS TIPO ACV (MELAS)





PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

Siempre
con el pueblo



DIRECTORIO:

M.C. ESP. JORGE ENRIQUE MEDINA RUBIO
DIRECTOR GENERAL

ECON. DAVID ALEJANDRO TEJADA PARDO
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO

M.C. ESP. JUAN MANUEL SIFUENTES MONGE
DIRECTOR EJECUTIVO DE LA DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN,
DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

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

M.C. ESP. ELISON SARAPURA CASTRO
JEFE DEL SERVICIO DE NEUROGENÉTICA

APOYO ADMINISTRATIVO:

TEC. LUIS MIGUEL CRUZADO SALAZAR
JEFE DE LA UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

BACH. DIEGO ALEXANDER FERIA ROJAS
UNIDAD DE ORGANIZACIÓN

OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO



Lima, Perú
2022





ÍNDICE

N°	CONTENIDO	PÁG.
	CUADRO DE CONTROL	05
I.	FINALIDAD	06
II.	OBJETIVO	06
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	06
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	06
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	06
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	06
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	07
	5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS	07
	5.3.1. RECURSOS HUMANOS	07
	5.3.2. MATERIALES	07
	5.3.2.1. IMPLEMENTOS MOLECULARES	07
	5.3.2.2. REACTIVOS QUÍMICOS	07
	5.3.2.3. MATERIAL DE PLÁSTICO	08
	5.3.2.4. MATERIAL DE VIDRIO	08
	5.3.2.5. OTROS MATERIALES	08
	5.3.2.6. EQUIPOS	08
	5.3.2.7. SOFTWARE	09
	5.3.3. SERVICIOS	09
VI.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	09
VII.	RECOMENDACIONES	12
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
IX.	ANEXOS	13
	ANEXO N° 01: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS	14
	ANEXO N° 02: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA MELAS	15
	ANEXO N° 03: BANDAS	16
	ANEXO N° 04: GRÁFICO DEL SOFTWARE	17



D. TEJADA P.





PERÚ

Ministerio
de SaludViceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en SaludInstituto Nacional
de Ciencias Neurológicas"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"Siempre
con el pueblo

GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA PARA ENCEFALOPATÍA MITOCONDRIAL CON ACIDOSIS LÁCTICA Y EPISODIOS TIPO ACV (MELAS)



ROL	ORGANO	FECHA	Vº Bº
ELABORADO	SERVICIO DE NEUROGENÉTICA	DICIEMBRE, 2021	
REVISADO POR	DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA AL APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROPATOLOGÍA	DICIEMBRE, 2021	
	DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	DICIEMBRE, 2021	
	OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO (UNIDAD DE ORGANIZACIÓN)	ENERO, 2022	
	ASESORÍA JURÍDICA	ENERO, 2022	
APROBADO	DIRECCIÓN GENERAL	ENERO, 2022	



GUIA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA PARA ENCEFALOPATÍA MITOCONDRIAL CON ACIDOSIS LÁCTICA Y EPISODIOS TIPO ACV (MELAS)

I. FINALIDAD

Apoyar el diagnóstico molecular del Síndrome de la Encefalopatía Mitocondrial con acidosis láctica y episodios tipo ACV (MELAS) a través de una guía técnica del análisis molecular de las principales mutaciones mitocondriales asociadas a MELAS, sustentada en la evidencia científica vigente para este procedimiento.

II. OBJETIVO

Normar el procedimiento de genotipificación de las mutaciones mitocondriales A3243G, T3271C ubicadas en el gen MT-TL1 y G13513A en el gen ND5 con una metodología basada en PCR-RFLP y análisis de Densitometría para la determinación del porcentaje de heteroplasmia de cada mutación, en apoyo al diagnóstico del Síndrome de MELAS.

III. AMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

- 81401.03 - MT-ND5 (tRNA leucina1 [UUA/G] codificada mitocondrialmente, NADH deshidrogenasa codificada mitocondrialmente 5) (p.ej., encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares [MELAS]), variantes comunes (p.ej., m.3243A>G, m.3271T>C, m.3252A>G, m.13513G>A)

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

- Síndrome de MELAS: La miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y episodios similares a ictus (MELAS) es uno de los desórdenes mitocondriales de herencia materna más frecuentes, que puede afectar a distintos órganos, implicando eventos neurológicos, metabólicos y motores. Este desorden se debe principalmente a alteraciones funcionales en la mitocondria como consecuencia de mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt), de las cuales la mutación A3243G es la de mayor frecuencia en pacientes con MELAS.
- Genotipificación del gen MT-TL1, proceso de la determinación del genotipo de un individuo con respecto a las mutaciones mitocondriales A3243G y T3271C.
- Genotipificación del gen NDS, proceso de la determinación del genotipo de un individuo con respecto a la mutación G13513A.
- PCR-RFLP, técnica molecular en la que primero se amplifica el gen a estudiar y luego el amplificado obtenido es digerido por una enzima de restricción obteniéndose fragmentos de diferentes tamaños que luego son analizados.
- Análisis de densitometría, mediante el software libre IMAGE J se analiza y calcula el porcentaje de heteroplasmia de las mutaciones.



5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- ADNmt, ácido desoxirribonucleico mitocondrial.
- A3243G, mutación en la que ocurre una transición del nucleótido adenina por guanina en la posición 3243 del ADN mitocondrial en el gen MT-TL1.
- T3271C, mutación en la que ocurre una transición del nucleótido timina por citocina en la posición 3271 del ADN mitocondrial en el gen MT-TL1.
- G13513A, mutación en la que ocurre una transición del nucleótido guanina por adenina en la posición 13513 del ADN mitocondrial en el gen ND5.
- Heteroplasmia, diferentes genomas mitocondriales mutados que se encuentran en una misma célula o tejido.

5.3. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

5.3.1. RECURSOS HUMANOS

- ✓ 01 biólogo con entrenamiento en biología molecular.
- ✓ 01 técnico de laboratorio.
- ✓ 01 médico neurogenetista.
- ✓ 01 médico genetista.

5.3.2. MATERIALES

5.3.2.1. Implementos moleculares

Secuencias de cebadores de PCR:

- ❖ Cebador Forward A3243G/T3271C 5'-AGGACAAGAGAAATAAGGCC-3'
- ❖ Cebador Reverse A3243G 5'-TAGAAGAGCGATGGTGAGAG-3'
- ❖ Cebador Antisentido T3271C 5'-TAAGAAGAGGAATTGAACCTCTGACCTTAA-3'
- ❖ Cebador Forward G13513A 5'-CCTCACAGGTTTCTACTCCGAA-3'
- ❖ Cebador Reverse G13513A 5'-CGAGTGCTATAGGCGCTT-3'
- ❖ GeneAmp® dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- ❖ Platinum® Taq DNA polymerase 5 U/μL (Invitrogen). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl₂ 50 mM
- ❖ Enzimas de restricción, 10U/uL de c/u : *Apal*, *AflII* y *BbsI*
- ❖ Agua ultrapura libre de nucleasas

5.3.2.2. Reactivos químicos

- ❖ Acrilamida
- ❖ Bisacrilamida
- ❖ TEMED
- ❖ Persulfato de amonio
- ❖ Tris
- ❖ Ácido bórico
- ❖ EDTA 0.5M pH 8
- ❖ Ácido Clorhídrico
- ❖ Xilencianol
- ❖ Azul de Bromofenol
- ❖ Glicerol
- ❖ Etanol absoluto
- ❖ Ácido acético
- ❖ Nitrato de Plata (AgNO₃)
- ❖ Hidróxido de sodio (NaOH)
- ❖ Formaldehído 37%
- ❖ Agua tridestilada



5.3.2.3. 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, 1000 µL
- ❖ Tubos de PCR 0.2 mL
- ❖ Tubos de centrifuga 1.5 mL
- ❖ Gradillas para tubos de 0.2 mL y 1.5 mL
- ❖ Pissetas
- ❖ Estación congelada para PCR
- ❖ Soporte para micropipetas

5.3.2.4. Material de vidrio

- ❖ Matraz aforado
- ❖ Probetas
- ❖ Vasos de precipitados
- ❖ Pipetas 1 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL.
- ❖ Propipetas
- ❖ Frascos
- ❖ Baguetas
- ❖ Botellas para reactivos químicos

5.3.2.5. Otros materiales

- ❖ Papel Lente
- ❖ Tiras reactivas de pH
- ❖ Mascarilla descartable (N-95 y quirúrgica)
- ❖ 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.
- ❖ Papel aluminio
- ❖ Parafilm

5.3.2.6. Equipos

- ❖ Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- ❖ Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- ❖ Cabina de PCR (ESCO®)
- ❖ Cámara de electroforesis vertical profesional (Cleaver)
- ❖ Fuente poder (Biorad)
- ❖ Balanza analítica (Shimadzu)
- ❖ Centrifuga (Eppendorf)
- ❖ Agitador magnético (Velp)
- ❖ Refrigeradores a 4°C (Thermo Scientific y Miray)
- ❖ Congeladora a 8°C/-20°C (Frigidaire)
- ❖ Picocentrífuga
- ❖ Vórtex
- ❖ Cronómetro
- ❖ Computadora de escritorio
- ❖ Impresora
- ❖ Sistema de alimentación eléctrica ininterrumpida
- ❖ Estabilizador



D. TEJADA P.



J. MEDINA

5.3.2.7. Software

- ❖ Software de libre acceso ImageJ
(<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

5.3.3. SERVICIOS

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

VI. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO				
N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
INICIO				
1	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Médico especialista (neurogenetista, médico genetista)	Servicio de Neurogenética
2	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO Tramitar la orden en la oficina de pre liquidación para que coloquen los datos de pre liquidación Pagar Ventanilla del SIS: 2 sellos (ROJO y AZUL)	Boleta de Pago o preliquidación con VB del SIS.	Personal de Oficina de Preliquidación Personal de admisión. Ventanilla CAJA	Contabilidad SIS Contabilidad
3	CONSENTIMIENTO INFORMADO	Formato de consentimiento informado firmado	Personal de área de Toma de Muestra	Servicio de Neurogenética
4	<u>EXTRACCIÓN DE ADN</u> (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
5	<u>PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN</u>	Alícuota de ADN con 10 ng	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética



**Genotipificación de las mutaciones A3243G, T3271C del gen MT-TL1 y G13513A del gen ND por PCR-RFLP****1. Amplificación por PCR de las mutaciones A3243G y T3271C**

Preparar la siguiente mezcla de reacción para una muestra problema, una muestra control y una muestra blanco:

En la cabina de PCR, preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra:

- Buffer de PCR para enzima Taq platinum 1X, 1 U/uL
- dNTPs 0.2mM c/u, 0,8 uL
- MgCl₂ 1.5mM, 0.3 uL
- Mix Cebador: Forward A3243G/T3271C, Reverse A3243G, Reverse T3271C
- Enzima Taq Platinum 0.04 U/uL, 0.1uL
- ADN 10ng/uL
- Completar con agua hasta 10ul

6

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 58°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos; seguido por un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

2. Amplificación por PCR de las mutaciones G13513A

- Buffer de PCR para enzima Taq platinum 1X, 1 U/uL
- dNTPs 0.2mM c/u, 0,8 uL
- MgCl₂ 1.5mM, 0.3 uL
- MixCebador: Forward G13513A, Reverse G13513A
- Enzima Taq Platinum 0.04 U/uL, 0.1uL
- ADN 10ng/uL
- Completar con agua hasta 10ul

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 58°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos; seguido por un paso de extensión final a 72°C por 10

Laboratorio de
NeurogenéticaServicio de
Neurogenética



minutos

Visualización de productos de PCR por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida no denaturante al 6%

Se utilizará un marcador de peso molecular para determinar el tamaño del producto obtenido.

Análisis de resultados (Anexo III):

- Presencia de banda de 429 pb para el caso del MT-TL1 con los cebadores para la detección de la mutación A3243G
- Presencia de banda de 170 pb para el caso del MT-TL1 con los cebadores para la detección de la mutación T3271C.
- Presencia de banda de 119 pb para el caso del ND5 con los cebadores para la detección de la mutación G13513A

Digestión enzimática del fragmento amplificado para la detección de la mutación A3243G y T3271C en el gen MT-TL1, y G13513A en el gen ND5

- Mutación A3243G:
5uL del producto de PCR es digerido con 2 U de la enzima Apal a 37°Cx 4 hr
- Mutación T3271C:
5uL del producto de PCR es digerido con 2 U de la enzima AfIII a 37°Cx 4 hr
- Mutación G13513A:
5uL del producto de PCR es digerido con 2 U de la enzima AfIII a 37°Cx 4 hr

Electroforesis en gel de agarosa al 6%. Se utilizará un marcador de peso molecular para identificar los fragmentos producto de la digestión enzimática.

Análisis de resultados (Anexo 4):

- **Positivo para la mutación A3243G:** se observarán dos bandas de 117 y 312 pb cada una, además de la banda de 429 pb.
- **Negativo para la mutación A3243G:** solo se observará la banda



	de 429 pb, correspondiente a la secuencia silvestre. — Positivo para la mutación T3271C: se observarán dos bandas de 140 y 30 pb cada una, además de la banda de 170 pb. — Negativo para la mutación T3271C: solo se observará la banda de 170 pb, correspondiente a la secuencia silvestre. — Positivo para la mutación G13513A: se observarán la banda de 119 pb, además de las bandas de 27 y 92 pb. Determinación del porcentaje de heteroplasmia Calculo de intensidad de las bandas de la electroforesis de los productos de la digestión enzimática, mediante el software ImageJ. Análisis de resultados (Anexo IV): Área de la gráfica generada representativa de cada banda del gel			
7	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 SCA12	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética

VII. 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.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Goto, Y., Nonaka, I., Horai, S. A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). Biochim Biophys Acta. 1991 Oct 21; 1097(3):238-40.
- Santorelli, F. et al. Identification of a novel mutation in the mtDNA ND5 gene associated with MELAS. Biochem Biophys Res Commun. 1997 Sep 18;238(2):326-8.
- White et al. Accurate Detection and Quantitation of Heteroplasmic Mitochondrial Point Mutations by Pyrosequencing. Genet Test. 2005; 9 (3): 190-199



D. TEJADA P.



J. MEDINA



ANEXO 01

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELETROFORESIS

POLIACRILAMIDA 21%		TBE 10X	
Bis acrilamida	20 g	Tris	54 g
Acrilamida	1 g	Ácido Bórico	27.5 g
H ₂ O _{ddd} hasta 100 mL		EDTA 0.5M pH 8.0	20 ml
		H ₂ O _{ddd} hasta 500 mL	
POLIACRILAMIDA NO DENATURANTE AL 6% (Stock de trabajo)		TBE 1X	
Poliacrilamida 21%	6 mL	TBE 10X	100 mL
TBE 10X	2.1 mL	H ₂ O _{ddd}	900 mL
H ₂ O _{ddd}	11.9 mL		
POLIACRILAMIDA NO DENATURANTE AL 8% (Stock de trabajo)			
Poliacrilamida 21%	8 mL		
TBE 10X	2.1 mL		
H ₂ O _{ddd}	11.9 mL		

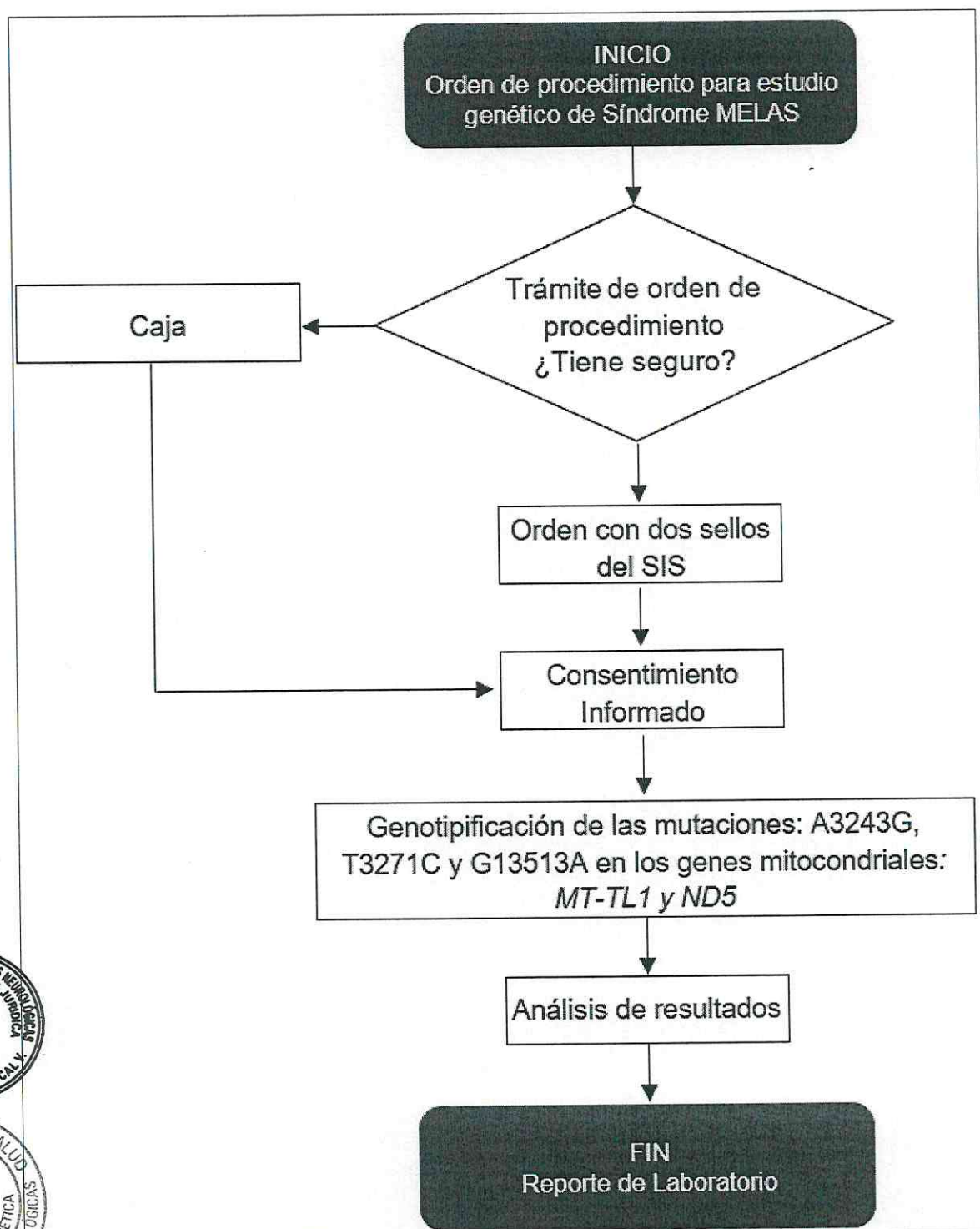
TINCIÓN ARGENTICA

SOLUCIÓN A (Fijación)		SOLUCIÓN B (Tinción)		SOLUCIÓN C (Revelado)	
Ácido acético	1 mL	Nitrato de plata	0.3 g	Hidróxido de sodio	3 g
Alcohol absoluto	10 mL	H ₂ O _{ddd} hasta 150 mL		H ₂ O _{ddd} hasta 150 mL	
H ₂ O _{ddd} hasta 150 mL				Agregar Formaldehído al 37%	1 mL



ANEXO 02

FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA GENÉTICA MELAS

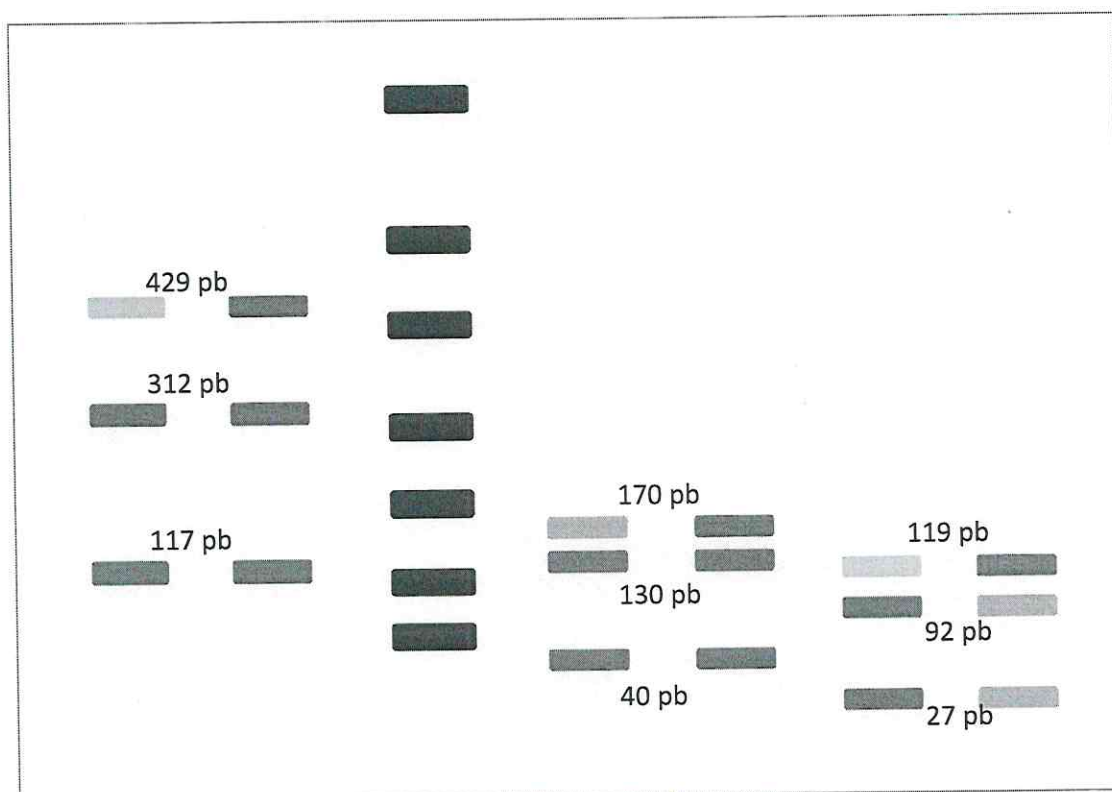


D. TEJADA P.



J. MEDINA

ANEXO 03 BANDAS

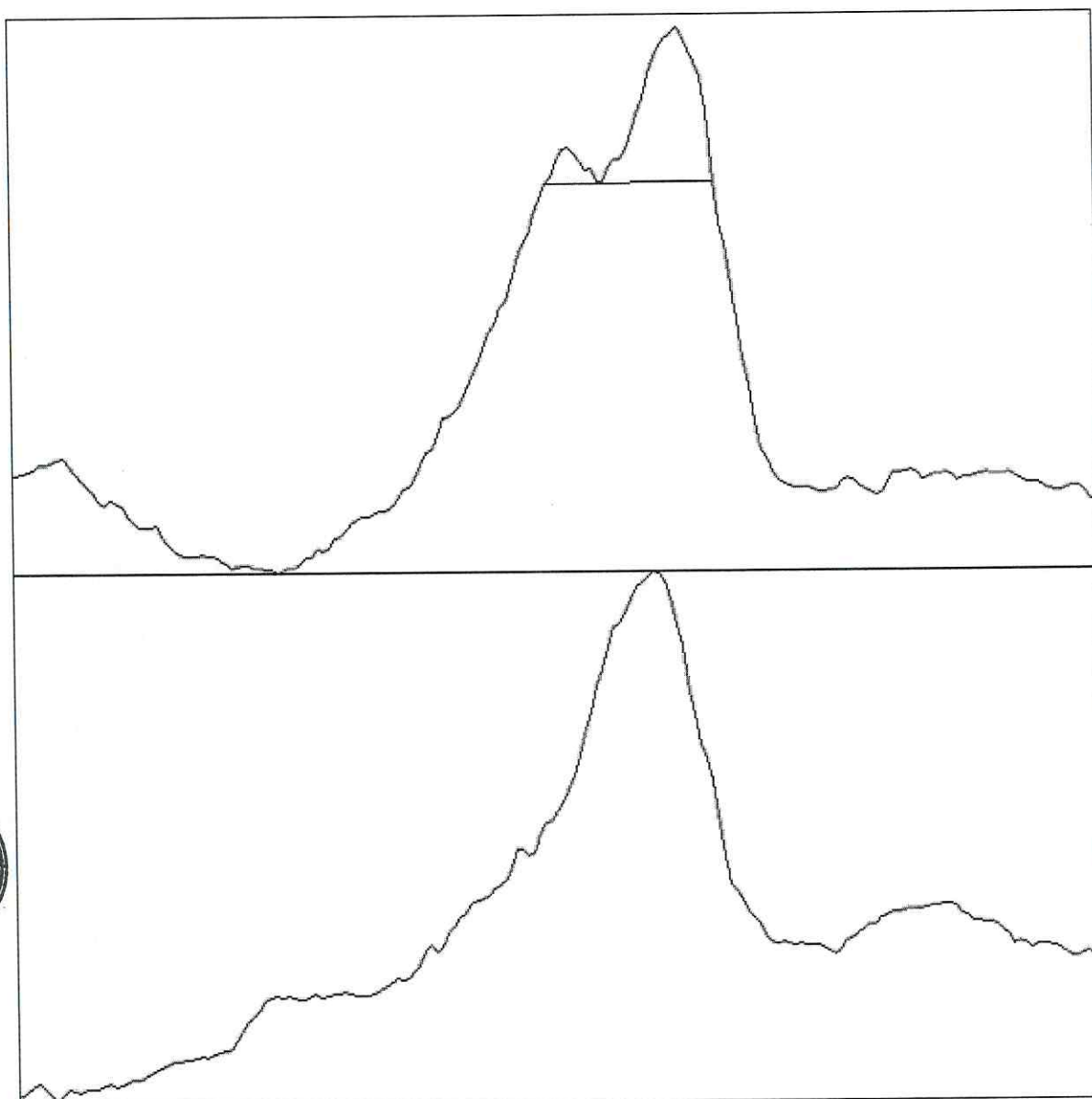


En el esquema se muestra el patrón de bandas esperado para cada mutación en estudio. En los carriles 1 y 2 se representan los resultados de la digestión enzimática para el análisis de la mutación A3243G, los carriles 4 y 5 para la mutación T3271C, y los dos últimos carriles para la G13513A. Para cada caso, la intensidad de las bandas reflejaría el porcentaje de heteroplasmia de la mutación.



ANEXO 04

GRÁFICO DEL SOFTWARE



Gráficas que se genera el software Imagen al analizar las intensidades de bandas de la imagen digitalizada del gel de poliacrilamida. El área debajo de la gráfica da un valor aproximado de la intensidad de la banda, lo que representaría el porcentaje de heteroplasmia.



D. TEJADA P.



J. MEDINA