



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Lima, 31 de Diciembre de 2019

VISTOS:

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

CONSIDERANDO:

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

Que, la Ley N° 27658, Ley Marco de Modernización de la Gestión del Estado, en su artículo 1° declara al Estado en proceso de modernización en sus diferentes instancias, dependencias, entidades, organizaciones y procedimientos, con la finalidad de mejorar la gestión pública y construir un Estado democrático, descentralizado y al servicio del ciudadano;

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

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

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



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



P. MAZZETTI S.

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

Que, mediante Decreto Supremo N° 054-2018-PCM, se aprobó los "Lineamientos de organización del Estado", con la finalidad de buscar que las entidades del Estado, conforme a su tipo, competencias y funciones, se organicen de la mejor manera a fin de responder a las necesidades públicas, en beneficio de la ciudadanía;

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

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

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

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

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

1. Extracción de ADN a partir de la Sangre Periférica: Tiene por objetivo normar el procedimiento de extracción de ADN a partir de sangre periférica.
2. Prueba Genética para la Enfermedad de Huntington: Tiene por objetivo normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CAG del gen HTT en apoyo al diagnóstico de la Enfermedad de Huntington (EH).
3. Prueba Genética para la Distrofia Miotónica Tipo 1: Tiene por objetivo normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CTG del gen DMPK en apoyo al diagnóstico de la Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1).
4. Prueba Genética para la Ataxia Espinocerebelosa Tipo 2 (SCA2): Tiene por objetivo normar el procedimiento de genotipificación del número de repeticiones CAG del gen ATXN2 en apoyo al diagnóstico de la ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2).



I. TAGLE L.



G. VARGAS



A. CARRASCO



P. MAZZETTI S.



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Lima, 31 de Diciembre de 2019



I. TAGLE L.

5. Prueba Genética Panel de Ataxias Hereditarias (SCAS): Tiene por objetivo normar el procedimiento de genotipificación de un panel de ataxias hereditarias dominantes (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, DRPLA, SCA12, SCA17) en apoyo al diagnóstico de las ataxias hereditarias.
6. Prueba Genética para Distrofia Tipo DYT1: Tiene por objetivo establecer el procedimiento de la prueba genética para la mutación 904-906delGAG/907-909delGAG del gen TORSINA1A, prueba diagnóstica para la Distrofia DYT1.
7. Prueba Genética para Distrofia Muscular de Duchenne por MLPA: Tiene por objetivo normar el procedimiento de análisis de la variación del número de copias del gen DMD a través de la técnica de Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA).
8. Prueba Genética para Neuropatías Hereditarias Sensitivo-Motora por MLPA: Tiene por objetivo normar el procedimiento de análisis de la variación del número de copias del gen PMP22 a través de la técnica de Multiplex Ligation Probe Amplificación (MLPA).
9. Prueba Genética para Ataxia de Friedreich: Tiene por objetivo normar el procedimiento de genotipificación del microsatélite GAA del gen FXN en apoyo al diagnóstico de la Ataxia de Friedreich.



A. CARRASCO



G. VALENZUELA

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

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

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

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

De conformidad con lo dispuesto por el Texto Único Ordenado de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado por Decreto Supremo N° 004-2019-JUS, Ley N° 26842, Ley General de Salud, la Ley N° 27658, Ley Marco de Modernización de la Gestión del Estado, Decreto Supremo N° 004-2013-PCM, que aprueba la política de



P. MAZZETTI S.



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

SE RESUELVE:

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

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

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

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

Regístrese y Comuníquese,

MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Dirección General
Med. Cir. Pilar Elena Mazzetti Soler
Directora de Instituto Especializado (e)

Visaciones y copias:
D. Ajdunta
OGC
OAJ



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

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

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

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



GUÍAS DE PROCEDIMIENTOS MÉDICOS

2019



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





PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

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

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS

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

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

SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



Dr. Carlos F. 16548 - PNE 1-5

Dr. Carlos F. 16548 - PNE 1-5
Jefe del Depto. de Neurol. y Psiquiatría



I. TAGLE L.

GUÍAS DE PROCEDIMIENTOS

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



P. MAZZETTI S.



G. VARGAS



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

DIRECTORIO:

M.C. ESP. PILAR E. MAZZETTI SOLER

DIRECTORA GENERAL

M.C. ESP. ISABEL B. TAGLE LOSTAUNAU

DIRECTORA ADJUNTA

ING. HÉCTOR R. NÚÑEZ FLORES

DIRECTOR EJECUTIVO DE LA OFICINA EJECUTIVA DE ADMINISTRACIÓN

LIC. GLORIA A. VARGAS NÚÑEZ

DIRECTORA EJECUTIVA DE LA OFICINA EJECUTIVA DE PLANEAMIENTO ESTRATÉGICO

M.C. ESP. MYRIAM VELARDE INCHAÚSTEGUI

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

M.C. ESP. DIANA RIVAS FRANCHINI

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN, DOCENCIA Y ATENCIÓN
ESPECIALIZADA EN APOYO AL DIAGNÓSTICO EN NEUROLOGÍA

M.C. ESP. MARIO R. CORNEJO OLIVAS

JEFE DEL SERVICIO DE NEUROGENÉTICA



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología
Jefe del Depto. de Neurología
Dra. Diana Rivas Franchini
C. 16554 - P.N.E. - 199



Lima, Perú
Agosto 2019



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

MED. ESP. PILAR ELENA MAZZETTI SOLER

MÉDICA NEURÓLOGA

MG. MARÍA VICTORIA MARCA YSABEL

INGENIERA QUÍMICA

BLGO. OLIMPIO ORTEGA DÁVILA

BIÓLOGO GENETISTA

MED. ESP. MARIO REYNALDO CORNEJO OLIVAS

MÉDICO NEURÓLOGO

BLGA. GEN. ANA KARINA MILLA NEYRA

BIÓLOGA GENETISTA

MED. ESP. MARYENELA ILLANES MANRIQUE

MÉDICA PSIQUIATRA

MED. ESP. ELISON HUGO SARAPURA CASTRO

MEDICO NEURÓLOGO

BLGO. ERICK GIANPIERRE FIGEROA ILDEFONSO

BIÓLOGO GENETISTA

BACH. DIANA CUBAS MONTECINO

BACHILLER EN GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

MED. ESP. ZOILA ANDREA RIVERA VALDIVIA

MÉDICA NEURÓLOGA

MED. ESP. JENY YSABEL BAZALAR MONTOYA

MÉDICA GENETISTA

SRTA. SANDRA VANESSA HURTADO ARANDA

APOYO ADMINISTRATIVO



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología
Dr. A. Vargas
Jefe del Departamento de Neurología



A. CARRASCO



G. VARGAS



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

ÍNDICE

1 – EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

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

2 – PRUEBA GENÉTICA PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurogenética



A. CARRASCO



G. VARGAS



L. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.



Servicio de Neurogenética

3 – PRUEBA GENÉTICA PARA LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1

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

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

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

5 – PRUEBA GENÉTICA PANEL DE ATAXIAS SCAS

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



L. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

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

6 – PRUEBA GENÉTICA PARA DISTONIA TIPO DYT1

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

7 – PRUEBA GENÉTICA PARA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE POR MLPA

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



L. TAGLE L.



P. MAZZETTI S



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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

8 – PRUEBA GENÉTICA PARA CMT1A POR MLPA

Nº	CONTENIDO	PÁG
	TÍTULO	100
I.	FINALIDAD	100
II.	OBJETIVO	100
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	100
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	100
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	100
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	100
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	100
VI.	REQUERIMIENTOS BÁSICOS	101
	6.1. RECURSOS HUMANOS	101
	6.2. MATERIALES	101
	6.3. SERVICIOS	103
VII.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	103
VIII.	DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO	103
IX.	RECOMENDACIONES	105
X.	ANEXOS	106
	10.1. ANEXO 1	106
	10.2. ANEXO 2	107
	10.3. ANEXO 3	108
	10.4. ANEXO 4	109
	10.5. ANEXO 5	110
XI.	BIBLIOGRAFÍA	111

9 – PRUEBA GENÉTICA PARA ATAXIA DE FRIEDREICH

Nº	CONTENIDO	PÁG
	TÍTULO	112
I.	FINALIDAD	112
II.	OBJETIVO	112
III.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	112
IV.	NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR	112
V.	CONSIDERACIONES GENERALES	112
	5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS	112
	5.2. CONCEPTOS BÁSICOS	112
VI.	REQUERIMIENTOS BÁSICOS	112
	6.1. RECURSOS HUMANOS	112
	6.2. MATERIALES	113
	6.3. SERVICIOS	114
VII.	CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS	114
VIII.	DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO	114
IX.	RECOMENDACIONES	116
X.	ANEXOS	117
	10.1. ANEXO 1	117
	10.2. ANEXO 2	118
	10.3. ANEXO 3	119
	10.4. ANEXO 4	121
XI.	BIBLIOGRAFÍA	122



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropsicología



A. CARRASCO



G. VARGAS



L. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada, en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

GUÍAS DE PROCEDIMIENTOS MÉDICOS

PRESENTACIÓN



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

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



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

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología

Diana Kizus Frauchun
Jefe del Epíto. de Neurop. i. i. i.
C.A. P. 14549 - PNP - 1998



A. CARRASCO



G. VARGAS



L. TAGLE L.



P. MAZZETTI S



1 - EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

I. FINALIDAD

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

II. OBJETIVO

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

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

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

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

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

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

- Genotipo humano: en el contexto de un estudio molecular, se refiere a los dos alelos o formas heredadas de un gen (o una variante de un gen) 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.

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Médica Neuropatóloga



A. CARRASCO



G. VARGAS



L. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.



6.2. MATERIALES

6.2.1. Reactivos químicos

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

6.2.2. Material de plástico

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

6.2.3. Material de vidrio

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



A. CARRASCO



G. VARGAS



L. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuro-patología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Depto. de Neuro-patología
C.A. 2165-9 - EXT. 154



6.2.4. Otros materiales

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



L. TAGLE L.

6.2.5. Equipos

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



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurogenética
Diana Kiyas Frauchin
Jefe del Departamento de Neurogenética
14.05.2017



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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

6.2.6. Software

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



6.3. SERVICIOS

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



VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Ninguna.

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

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



L. TAGLE L.



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Laboratorio de Neurogenética
Claudia Reyes Franchini
Jefe del Depto. de Neurogenética
2023-01-16



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

	Aislamiento de linfocitos - Homogenizar los tubos por inversión cuidadosamente y colocar el contenido en un tubo cónico tipo falcon estéril de 50 mL. - Enraizar hasta 50 mL con Solución de Lisis de Glóbulos Rojos (SLR). - Centrifugar a 4000 RPM por 2 minutos. - Eliminar el sobrenadante. - Agregar de 10 a 25 mL de SLR y agitar suavemente hasta eliminar los residuos de glóbulos rojos en el precipitado (aspecto blanquecino). - Eliminar el sobrenadante. - Si el precipitado aún contiene glóbulos rojos (aspecto rojizo), resuspender el precipitado por agitación en 25 mL de SLR. - Centrifugar a 4000 RPM por 1 minuto. Lisis celular y aislamiento de ADN - Agregar 5 mL de Solución de Proteinasa K. - Resuspender el precipitado por agitación. - Incubar a 37 °C por 24 horas. - Si aún se observan restos del precipitado (aspecto grumoso), homogenizar e incubar a 37 °C por 24 horas. - Agregar 50 mL de alcohol etílico 96° frío (previamente almacenado a -20 °C). - Homogenizar suavemente hasta observar la formación de un precipitado. - Recuperar el precipitado con una pipeta Pasteur estéril y eliminar el alcohol etílico 96°. - Agregar 50 mL de alcohol etílico 70 °C frío (previamente almacenado a -20 °C). Homogenizar suavemente. - Recuperar el precipitado con una pipeta pasteur estéril y colocarlo en un tubo de centrifuga de 2 mL estéril. - Envolver el tubo de centrifuga en papel toalla. Almacenar a temperatura ambiente hasta la evaporación completa de los restos de alcohol (de 24 a 48 horas). Resuspensión de ADN - Resuspender el precipitado en 800 uL de buffer TE low. - Mantener a 37 °C hasta la resuspensión completa.			
8	EVALUAR LA CALIDAD DE ADN Diluir 2uL de ADN stock en 14uL de H₂O_{dd}. Homogenizar con vortex por 5 segundos. Cuantificación de ADN con espectrofotometría: Calibrar el espectrofotómetro con CV<2%. Empleando 2uL de muestra diluida seleccionar el protocolo de cuantificación que considere medidas 230, 260, 280 y 320nm. Cuantificación de ADN con fluorescencia: Calibrar el equipo Qubit con dos muestras control: 0 ng/uL y 100 ng/uL. Empleando 2uL de muestra diluida agregar 198uL de solución de trabajo (199uL de solución Buffer + 1uL de fluoróforo). Realizar la lectura de dsDNA. Integridad de ADN: Agregar 40ng de ADN y 3uL de fluoróforo en un gel de agarosa 0.7%. Revelar fluoróforo con luz azul.	[ácidos nucleicos](ng/uL) A260/A280 A230/A260 [dsDNA](ng/uL) Índice de integridad	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
9	ALMACENAMIENTO DEL ADN EXTRAÍDO Almacenar la muestra de ADN extraída y resuspendida a -20°C.	ADN almacenado	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
10	REGISTRO Y REPORTE DE PROCEDIMIENTO Registrar "ADN disponible" en base de datos "Ingreso de muestras".	Información registrada en base de datos	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
FIN				



L. TAGLE L.



P. MAZZETTI S



A. CARRASCO



G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchin
Especialista en Neuropatología
C. B. 16302, C. DNEP - 154



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

IX. RECOMENDACIONES

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Diagnóstico y Tratamiento
Jefe



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

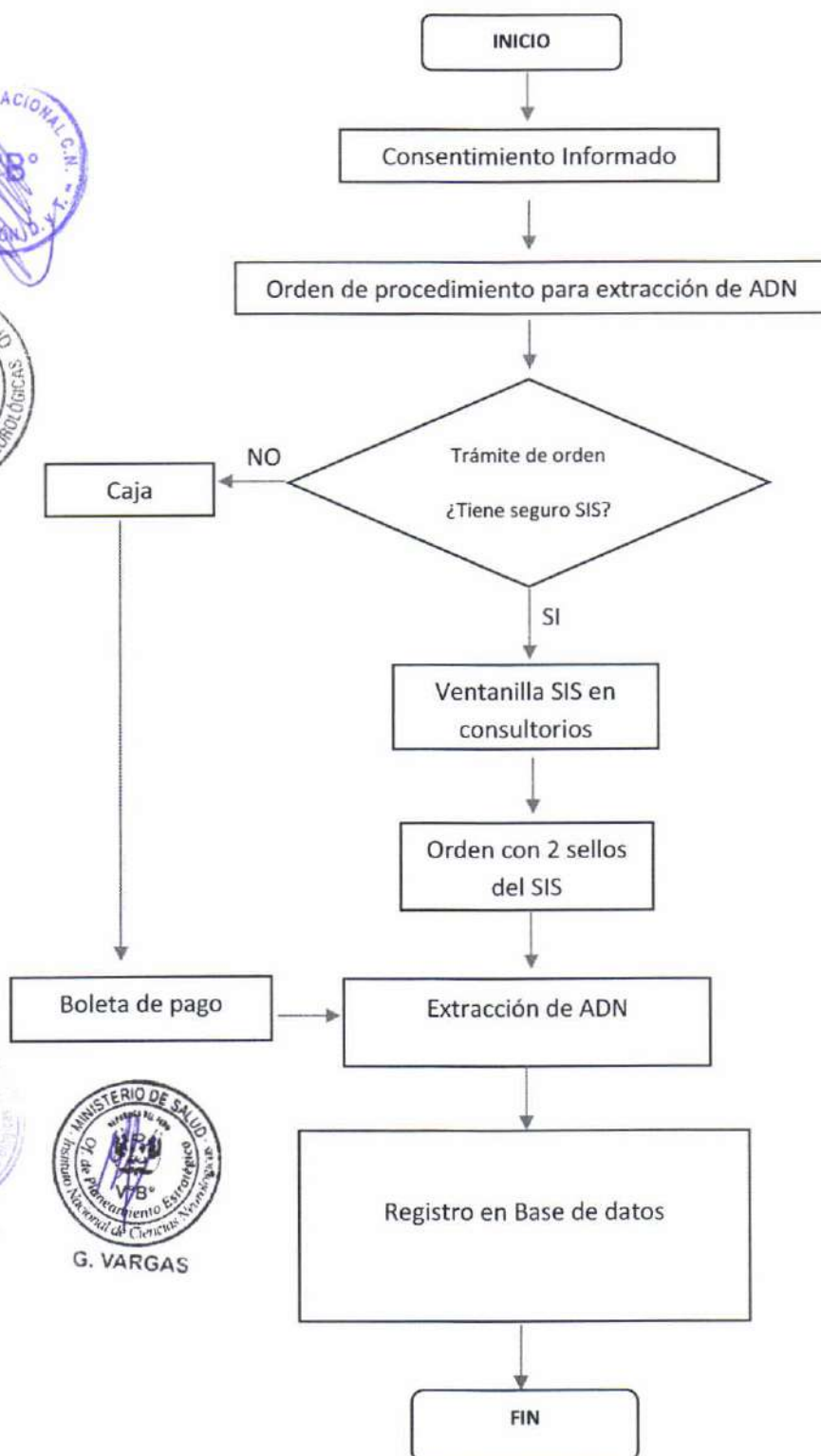


Servicio de Neurogenética

X. ANEXOS

ANEXO 1

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología
Dr. Carlos Kuras Frauchiger
Jefe del Depto de Neurología
C.A. P. 16-018 - FNE



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

ANEXO 2

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

Solución de Lisis de Glóbulos Rojos (SLR)

Tris 2M pH 7.5	5 mL
MgCl 1M	5 mL
NaCl 3M	3.3 mL

Enrasar a 1L con agua tridestilada.

Solución de Proteinasa K

Tris HCl 2M pH 8.6	0,25 mL
EDTA 0.5M pH 8,0	0,5 mL
SDS 10%	1 mL
NaCl 3M	3,33 mL
Proteinasa K 20 mg/mL	0,25 mL

Enrasar a 50 mL con agua tridestilada

Buffer TE Low

Tris HCl 1M pH 8.0	5 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	200 uL

Enrasar a 100 mL con agua tridestilada.

TBE 10X

Tris base	54 mL
Ácido Bórico	27,5 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	200 uL

Enrasar a 500 mL con agua tridestilada.

Agarosa 0.7%

Agarosa	0.7 g
TBE 10X	5 mL

Enrasar a 50 mL con agua tridestilada.



L. TAGLE L.



R. MAZZETTI S.

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología
Dr. Rivas Franchini
Calle 1450 - 1501 - Lima - Perú



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

Solución de reconstitución de Proteinasa K

Tris 1M pH 7.5	200 uL
CaCl ₂ 0.5M	800 uL
Glicerol	10 mL
Enrasar a 20 mL con agua tridestilada.	

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

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

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

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

MgCl₂ 1M: Prepare 100 mL de solución MgCl₂ 1M disolviendo 9.5 g de NaCl en 80 mL de agua tridestilada. Aforar a 100 mL.

CaCl₂ 1M: Prepare 20 mL de solución CaCl₂ 1M disolviendo 1.1 g de NaCl en 15 mL de agua tridestilada. Aforar a 20 mL.



G. VARGAS



L. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Diagnóstico y Tratamiento
Diana Reyes Frauchin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A. P. 16548 - BNE



XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Miller S, Dykes S, Polesky H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16(3):1215.
2. Kalousová M, Levová K, Kuběna AA, Jáchymová M, Franková V, Zima T. Comparison of DNA isolation using salting-out procedure and automated isolation (MagNA system). *Prep Biochem Biotechnol.* 2017 Aug 9;47(7):703-708.



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Karas Franchin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.N. P. 15549 - RNE



2 - PRUEBA GENÉTICA PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

I. FINALIDAD

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

II. OBJETIVO

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

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

CPT: 81416 - PRUEBA GENÉTICA PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

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

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología

Guía Rivas Franchini
del Depto. de Neurogenética
16.10.16 - RNF - 1.57



G. VARGAS



L. TAGLE L.



P. MAZZETTI S



VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

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

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

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

6.2.2. Reactivos químicos

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



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A. P. 15548 - PNE - 15548



6.2.3. Material de plástico

- Tips con filtro 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL
- Tubos de PCR de tapa plana 0.2 mL
- Tubos de PCR de tapa cónica 0.2 mL
- Microamp™ 8-Tube Strip, 0.2mL
- Microamp™ 8-Cap Strip
- Tubos de 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



6.2.4. Material de vidrio

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



6.2.5. Otros materiales

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Epto. de Neuropatología
C.A. P. 15568 - PNE



Servicio de Neurogenética

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

6.2.6. Equipos

- Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- Analizador genético SeqStudio™ (Applied Biosystems)
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- Sistema de documentación de geles OmniDoci (Cleaver Scientific)
- Cabina de PCR (ESCO®)
- Cámara de electroforesis vertical profesional (Cleaver)
- Fuente poder (Cleaver)
- Balanza analítica (Shimadzu)
- Agitador magnético (Velp)
- Refrigeradores a 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

6.2.7. Software

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

6.3. SERVICIOS

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

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

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



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
INICIO				
1	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO	Documento de Consentimiento Informado firmado	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
2	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
3	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO <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	Oficina de Preliquidación Ventanilla CAJA Ventanilla SIS	Contabilidad Contabilidad SIS
4	REGISTRAR LOS DATOS DEL PACIENTE	Información registrada en base de datos Solicitud de procedimiento molecular	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
5	EXTRACCIÓN DE ADN (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN	Alicuota de ADN con concentración 10 ng/uL	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
7	GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG POR PCR Para cada paciente se analizarán 2 muestras de ADN genómico obtenidas independientemente. Además, se empleará una muestra problema, un estándar de secuencia específica y una muestra blanco. <i>Amplificación del microsatélite CAG del gen HTT</i> Preparar 10 uL de mezcla por cada reacción con las siguientes concentraciones finales: • DMSO 7% • Buffer de PCR para enzima Taq Platinum 1X • dNTPs 0.05mM c/u • MgCl₂ 1mM • Cebador HD3 0.4uM • Cebador HD5 0.4uM • Enzima Taq Platinum 0.04 U/uL • ADN 1ng/uL Enrasar a 10uL con agua ultrapura. Emplear el siguiente programa de amplificación: 2 minutos de denaturación inicial a 95°C, 28 ciclos de denaturación a 95°C por 1 minuto, hibridación a 65°C por 30 segundos, y extensión a 75°C por 45 segundos; seguido por un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos. <i>Visualización de productos de PCR por electroforesis en gel de poliacrilamida</i> Preparar un gel de poliacrilamida al 8% no denaturante para la electroforesis de los productos de PCR. Sembrar en cada pocillo 2uL de producto de PCR con 2uL de buffer de siembra. Además, se debe sembrar en un	Genotipo para los alelos de microsatélites CAG	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética



L. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.



Servicio de Neurogenética

pocillo 1uL marcador de peso molecular de 10pb con 2uL de buffer de siembra.

Administrar un voltaje de 200 V por 30 minutos. Realizar tinción argéntica del gel usando solución de fijación, solución de tinción y solución de revelado. Verificar que las muestras hayan sido amplificadas correctamente.

Preparación de placa de fragmentos usando Termociclador SimpleAmp

En tubos de PCR proceder con los siguientes pasos:

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

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

Desnaturalizar las muestras a 98°C por 5 minutos.

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

Electroforesis capilar usando Analizador genético SeqStudio™

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

Análisis de resultados y estimación del número de repeticiones

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

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

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

GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG POR TP-PCR

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

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Biológicas
Departamento de Neumología

Diana Rivas Franchina
 Jefe del Depto. de Neurología



Servicio de Neurogenética

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

Amplificación por TP-PCR usando termociclador Proflex

Preparar la siguiente mezcla de reacción para una muestra control positiva para *HTT*, una muestra control negativa para *HTT*, una muestra problema y una muestra blanco.

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

DMSO 4%

Buffer de PCR 1X para enzima Long PCR

dNTPs 0.2mM c/u

MgCl₂ 2.3mM

Cebador HD-TP-F 0.1M

Cebador HD-TP-R 0.1uM

Enzima Long PCR DNA polimerasa 0.07 U/uL

ADN 0.5ng/uL

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

Visualización de productos de PCR por electroforesis en geles de poliacrilamida

Preparar un gel de poliacrilamida al 10% no denaturante para la electroforesis de los productos de PCR.

Sembrar en cada pocillo 4uL de producto de PCR con 3uL de buffer de siembra. Además, se debe colocar un 0.7 uL marcador de peso molecular de 10pb con 2uL de buffer de siembra.

Administrar un voltaje de 200 V por 1 hora.

Realizar tinción argéntica del gel usando solución de fijación, solución de tinción y solución de revelado.

Verificar que las muestras hayan sido amplificadas correctamente.

Preparación de la placa de fragmentos usando Termociclador Proflex

Emplear el protocolo descrito para la preparación de la placa de fragmentos para productos de PCR.

Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador.

Electroforesis capilar usando el analizador genético SeqStudio™

Usando el Software Plate manager se ingresa la información de la placa para que sea reconocida por el analizador genético.

Una vez preparada la placa, las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar.

Se empleará el protocolo descrito para la electroforesis capilar de placa de fragmentos para productos de PCR.

Análisis de resultados

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



L. TAGLE L.



R. MAZZETTI S.

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C. M. P. 1554 R - PNE - 550



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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

IX. RECOMENDACIONES

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



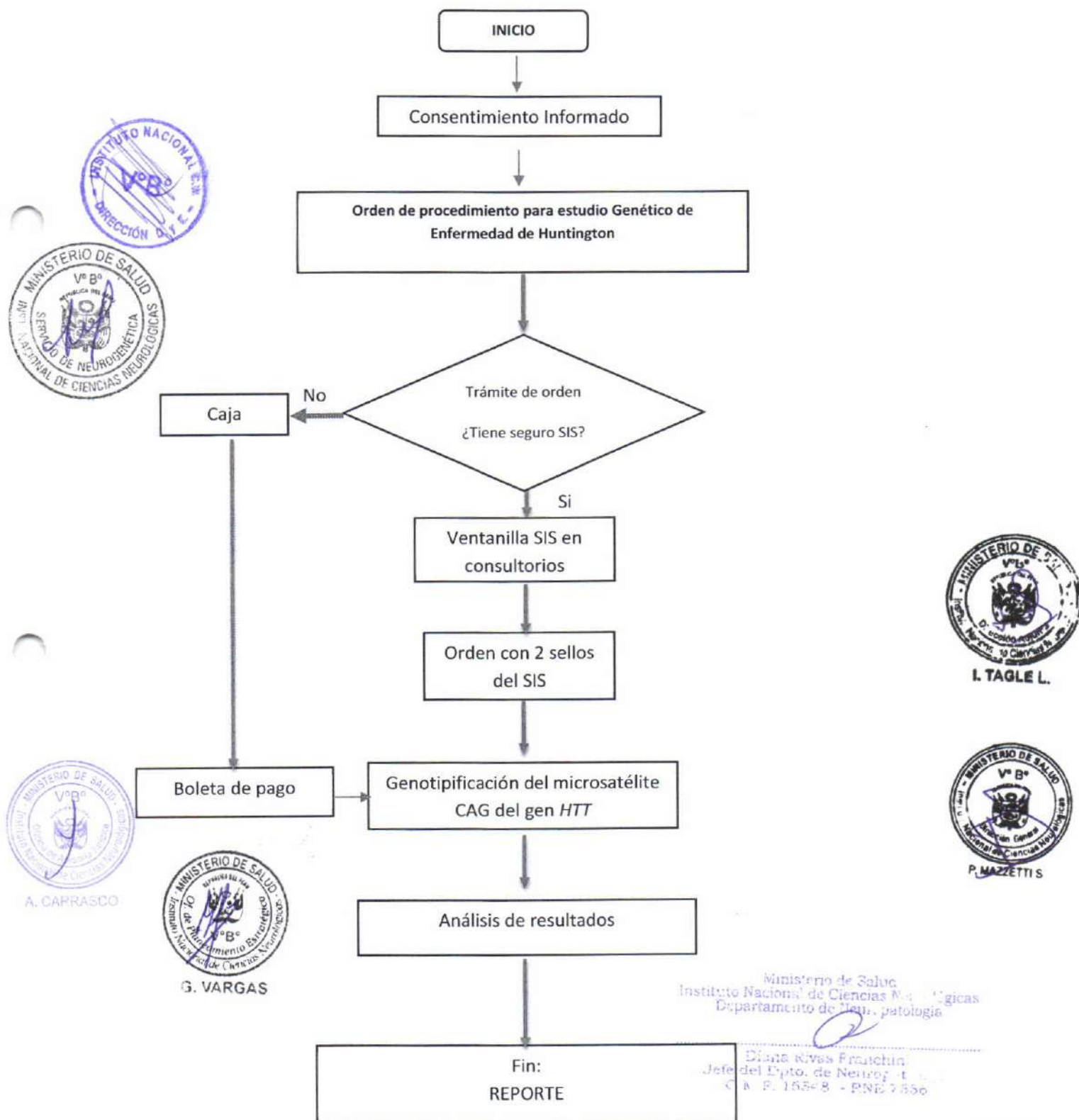
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Blanca Nivas Franchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.P. 15348 - PNE 1558

X. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

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

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

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

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

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

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

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

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

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

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

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

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

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo:

DNI:

Fecha y hora:

Firma: _____

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incn.gob.pe

J. Arancibia N. 2011 Lima Central, Perú
Teléfono: +51 1 471 1000
Email: inform@inccn.gob.pe

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A. P. 16543 - RNE 1656



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

ANEXO 3

FORMATO DE REPORTE DE RESULTADO PARA PRUEBA GENÉTICA DE EH



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional de
Ciencias Neurológicas

Neurogenética

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

Nombres y Apellidos:

Fecha de nacimiento:

Sexo:

Status clínico:

Tipo de muestra:

Estado de la muestra:

Código de la muestra:

Método de obtención:

Remitente:

Fecha de obtención:

Fecha de emisión de resultado:

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

RESULTADO MOLECULAR

Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.

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

Alelo 1: repeticiones CAG.

Alelo 2: repeticiones CAG.

INTERPRETACIÓN

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

Alelos normales: ≤26 repeticiones CAG.

Alelos normales mutables: 27 a 35 repeticiones CAG, no presentan enfermedad, sin embargo, podrían transmitir rango patológico a descendencia.

Alelos penetrancia reducida: 36 a 39 repeticiones CAG, podrían o no manifestar la enfermedad.

Alelos de penetrancia completa, patológico: A partir de 40 o más repeticiones, las personas que poseen estos alelos manifiestan o manifestarán la enfermedad.

PROCEDIMIENTO

El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones el exón 1 del gen de *HTT* consiste en la amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia y electroforesis capilar en Analizador genético SeqStudio™ (Applied Biosystems) empleando protocolo optimizado en Laboratorio de Neurogenética.

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

CONCLUSIONES

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

Fecha de entrega de reporte a paciente:

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

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Jr. Ancash N° 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7776
Correo electrónico: infomes@innngen.org.pe

Diana Rivas Franchin
Jefe del Epto. de Neurogenética
C.N. P. 16548 - PNE 3556



Servicio de Neurogenética

ANEXO 4

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

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

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

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

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

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



L. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.



A. CARRASCO



G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología y Patología

Diana Silvia Franchini
Jefe del Depto. de Neurología y Patología
C.M. P. 16548 - PNE 7556



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

Ladder de 10pb

Ladder de 10pb	2 uL
Agua tridestilada	8 uL

Mix de cebadores HD-PCR 20uM

HD3 (100uM)	10 uL
HD5 (100uM)	10 uL
Agua ultrapura	30 uL

Mix de cebadores HD-TP-PCR 20uM

HD-TP-F (100uM)	10 uL
HD-TP-R (100uM)	10 uL
Agua ultrapura	30 uL

Mix de dNTPs 10mM (2.5mM c/u)

Adenina – A (100 mM)	2.5 uL
Timina – T (100 mM)	2.5 uL
Guanina – G (100 mM)	2.5 uL
Citosina – C (100 mM)	2.5 uL
Agua ultrapura	90 uL

Soluciones de Tinción argéntica

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

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

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

I. TAGLE L.

P. MAZZETTI S



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Jama, Mohamed et al. (2013). Triplet Repeat Primed PCR Simplifies Testing for Huntington Disease. The Journal of Molecular Diagnostics, Volume 15, Issue 2, 255 – 262.
2. Goldberg YP, Andrew SE, Clarke LA, Hayden MR. A PCR method for accurate assessment of trinucleotide repeat expansion in Huntington disease. Hum Mol Genet. junio de 1993;2(6):635-6.
3. Andrew SE, Goldberg YP, Theilmann J, Zeisler J, Hayden MR. A CCG repeat polymorphism adjacent to the CAG repeat in the Huntington disease gene: implications for diagnostic accuracy and predictive testing. Hum Mol Genet. Enero de 1994;3(1):65-7.
4. ACMG/ASHG statement. Laboratory guidelines for Huntington disease genetic testing. The American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Huntington Disease Genetic Testing Working Group. Am J Hum Genet. Mayo de 1998;62(5):1243-7.



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Ivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.I.M. 15548 - PNE 1556



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

I. FINALIDAD

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

II. OBJETIVO

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

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

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

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

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

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología
Diana Rivas Franchini
Jefe de Neurogenética
DNE 7-50



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



P. MAZZETTI S



G. VARGAS



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

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

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

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

6.2.2. Reactivos químicos

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



A. CARRASCO



G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.N. P. 16543 - RNE 7656



- Formaldehído 37%

6.2.3. Material de plástico

- Micropipetas 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L y 1000 μ L.
- Tips con filtro 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L y 1000 μ L
- 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

6.2.4. Material de vidrio

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

6.2.5. Otros materiales

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



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neurología
C.I.A.F. 16548 - R.N.E. 7656



Servicio de Neurogenética

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

6.2.6. Equipos

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

6.2.7. Software

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

6.3. SERVICIOS

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Frauchini
Jefe del Epto. de Neuropatología
C.A.P. 16548 - RNE 2556



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

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

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

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



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

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 1µL de producto de PCR con 1µL de buffer de siembra. Además, se debe colocar un 0.85µL marcador de peso molecular de 10pb con 1µL de buffer de siembra. Administrar un voltaje de 200 V por 45 minutos. Realizar la tinción del gel con el protocolo de tinción argéntica usando solución de nitrato de plata. Verificar la adecuada amplificación de las muestras problema.

Preparación de placa de fragmentos usando Termociclador Veriti

En una placa compatible con el equipo proceder con los siguientes pasos:

Preparar una mezcla de 9.35 µL de Formamida 0.15 µL Marcador GeneScan™ 500 LIZ, por cada muestra, control y muestra blanco a evaluarse. Dispensar 9.5 µL de la mezcla en cada pocillo de la placa.

Añadir 1 µL del producto de amplificación obtenido en las reacciones de PCR.

Desnaturalizar las muestras a 98°C por 5 minutos.

Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador (periodos menores a 24 horas) o -20°C (periodos mayores a 24 horas).

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.

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

GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CTG POR TP-PCR

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



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.I. P. 16548 - PNE - 15



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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

Amplificación por TP-PCR usando termociclador Veriti:

Preparar la siguiente mezcla de reacción para una muestra control positiva para DM1, una muestra control negativa para DM1, una muestra problema y un control de PCR. En la cabina de PCR, preparar 10 uL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra:

DMSO 4%
Buffer de PCR 1X para enzima taq Long PCR
dNTPs 0.25mM c/u
MgCl₂ 1.25mM
Cebador P2 2uM
Cebador P4CAG 0.4uM
Cebador P3R 2uM
Enzima Long PCR DNA polimerasa 0.1 U/uL
ADN 4ng/uL

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

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

Preparación de la placa de fragmentos usando Termociclador Veriti:

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

Electroforesis capilar usando el analizador genético SeqStudio™

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

Análisis de resultados

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



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Kivus Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.I. P. 16548 - RNE 7556



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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

IX. RECOMENDACIONES

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



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S.

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

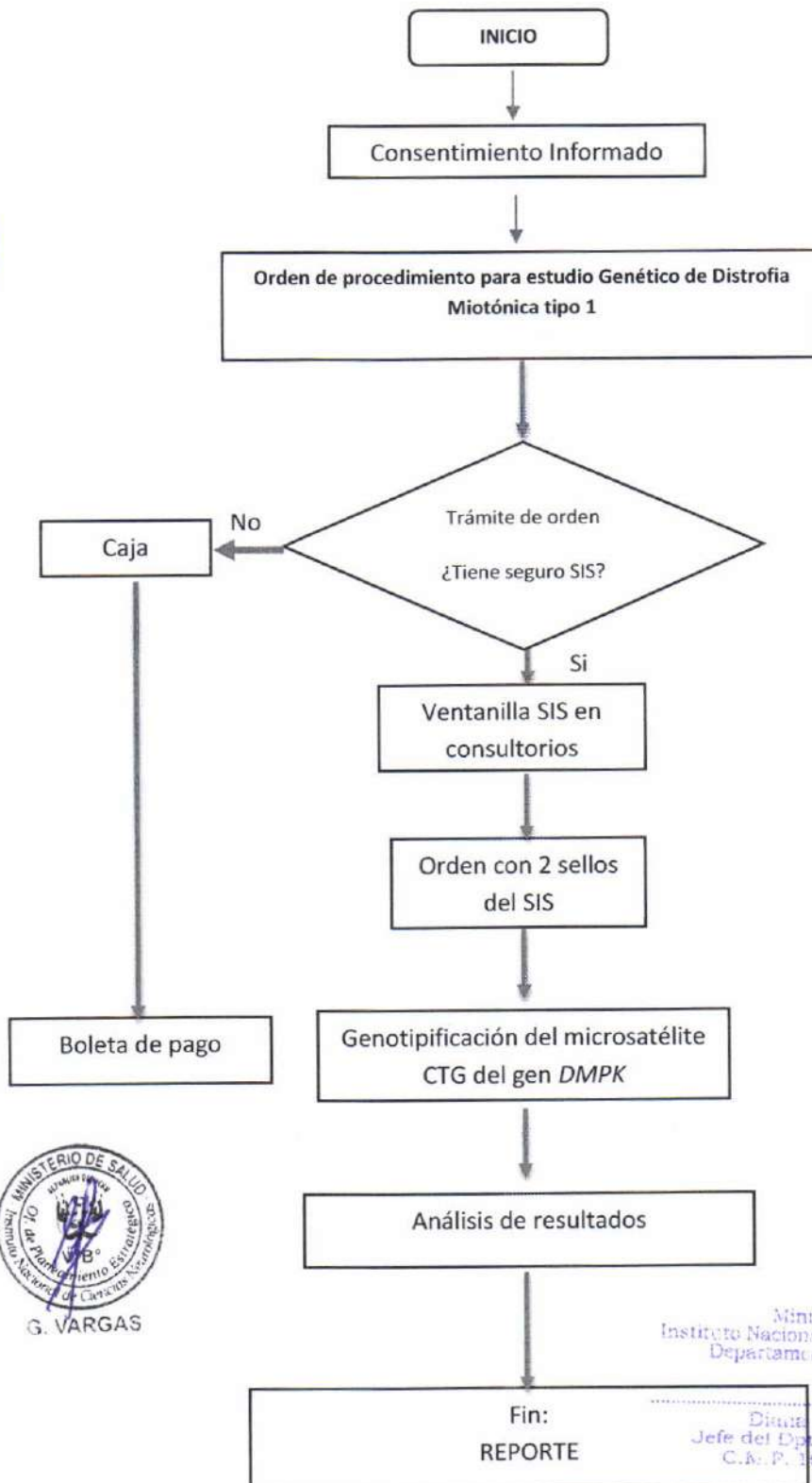
Diana Kivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.F. 16543 - R.N.S. 0356



X. ANEXOS

ANEXO 1

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





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

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

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

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

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

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

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

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

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

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

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

Nombre completo:

DNI:

Firma:

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

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

Nombre completo:

DNI:

Firma:

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo:

DNI:

Fecha y hora:

Firma:

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incn.gob.pe

J. Ancochea N°1271 Lima Cercado, Perú
Teléfono: +51 1 441 7777
Email: inform@incn.gob.pe

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Diagnóstico y Patología

Diana Rivas Frauchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A. P. 16548 - FNE 1556



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

ANEXO 3

FORMATO DE REPORTE DE RESULTADO PARA PRUEBA GENÉTICA DE DM1



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Neurogenética

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

Nombres y Apellidos:

Fecha de nacimiento:

Sexo:

Status clínico:

Tipo de muestra:

Estado de la muestra:

Código de la muestra:

Método de obtención:

Remitente:

Fecha de obtención:

Fecha de emisión de resultado:

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

RESULTADO MOLECULAR

Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.

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

Alelo 1:

repeticiones CTG.

Alelo 2:

repeticiones CTG.

INTERPRETACIÓN

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

Alelos normales: hasta 34 repeticiones CTG.

Alelos normales mutables: rango de 35 a 49 repeticiones CTG. No presentan enfermedad, sin embargo, podrían transmitir rango patológico a descendencia

Alelos de penetrancia completa, patológicos: A partir de 50 o más repeticiones CTG. Las personas que poseen estos alelos manifiestan o manifestarán la enfermedad.

PROCEDIMIENTO

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

CONCLUSIONES

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

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

Fecha de entrega de reporte a paciente:

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

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Jr. Ancash N° 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 419 7779
Correo electrónico: inform@incn.org.pe



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

ANEXO 4

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

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

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

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

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

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

Ladder de 10pb	
Ladder de 10pb	2 uL

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.I.A.P. 16598 - RNE 7156



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

Agua tridestilada	8 uL
-------------------	------

Mix de cebadores DM1-PCR 20uM

DMPK-P1 (100uM)	10 uL
DMPK-P2 (100uM)	10 uL
Agua ultrapura	30 uL

Mix de dNTPs 10mM (2.5mM c/u)

Adenina – A (100 mM)	2.5 uL
Timina – T (100 mM)	2.5 uL
Guanina – G (100 mM)	2.5 uL
Citosina – C (100 mM)	2.5 uL
Agua ultrapura	90 uL

Soluciones de Tinción argéntica

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

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

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



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Kivas Franchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.A. 2. 155-8 - PNP

**XI. BIBLIOGRAFÍA**

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



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S.

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A. P. 16548 - P.O. Box 16548



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

I. FINALIDAD

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

II. OBJETIVO

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

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESYTANDARIZAR

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

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

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

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

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





Servicio de Neurogenética

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

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

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

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

- Cebador 2A: 5'-GGGCCCCCTACCATGTCTG-3'
- Cebador 2B: 5'-CGGGCTTGCGGACATTGG-3'
- Cebador R1: 5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACGCTGCTGCTGCTGCTG-3'
- Cebador R2: 5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACG-3'
- dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- DMSO 100% (Sigma-Aldrich)
- Agua ultrapura libre de nucleasa
- Long PCR Enzyme mix 5 U/μL (Thermo Scientific). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl₂ 25 mM.
- Platinum® Taq DNA polymerase 5 U/μL (Invitrogen). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl₂ 50 mM.
- Marcador de peso molecular de 10 pb (Invitrogen)
- GeneScan LIZ 500 dye Size Standard
- Hi-Di Formamide
- SeqStudio Genetic Analyzer Cartridge
- SeqStudio™ Cathode Buffer Container

6.2.2. Reactivos químicos

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



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



G. VARGAS



B. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Dr. NIVUS FRANCHINI
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.A.P. 155-8 - PNP 155-8



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

6.2.3. Material de plástico

- Micropipetas 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL.
- Tips con filtro 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL
- Tubos de PCR de tapa plana 0.2 mL
- Tubos de PCR de tapa cónica 0.2 mL
- Microamp™ 8-Tube Strip, 0.2mL
- Microamp™ 8-Cap Strip
- Tubos de 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

6.2.4. Material de vidrio

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

6.2.5. Otros materiales

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



A. CARRASCO



P. MAZZETTI S.



G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Serv. de Neuropatología
T. 01 616 5481 - 616 5482



Servicio de Neurogenética

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



6.2.6. Equipos

- Termociclador Proflex (Applied Biosystems)
- Analizador genético SeqStudio™ (Applied Biosystems)
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- Sistema de documentación de geles OmniDoc (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

6.2.7. Software

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

6.3. SERVICIOS

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



A. CARRASCO



G. VARGAS



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Ivas Franchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.A. P. 16548 - RNE 7456



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

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

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
INICIO				
1	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO	Documento de Consentimiento Informado firmado	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
2	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
3	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO <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	Oficina de Preliquidación Ventanilla CAJA Ventanilla SIS	Contabilidad Contabilidad SIS
4	REGISTRAR LOS DATOS DEL PACIENTE	Información registrada en base de datos Solicitud de procedimiento molecular	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
5	EXTRACCIÓN DE ADN (según procedimiento estándar del Laboratorio de Neurogenética)	ADN genómico	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
6	PREPARACIÓN DE ADN PARA GENOTIPIFICACIÓN	Alícuota de ADN con concentración 10 ng/μL	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 ATXN2</i> En la cabina de PCR, preparar 10 μL de mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales para cada muestra: • DMSO 5% • Buffer de PCR para enzima taq platinum 1X • dNTPs 0.05mM c/u • MgCl₂ 0.75mM • Cebador SCA2-A 0.5μM • Cebador SCA2-B 0.5μM • Enzima taq platinum 0.04 U/μL • ADN 2ng/μL Emplear el siguiente programa de amplificación: 2 minutos de denaturación inicial a 94°C, 28 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, hibridación a 64°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos; seguido por un paso de extensión final a 72°C	Genotipo para los alelos del microsatélite CAG	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética



Servicio de Neurogenética

por 7 minutos.

Visualización de productos de PCR por electroforesis en gel de poliacrilamida

Preparar un gel de poliacrilamida al 6% no denaturante para la electroforesis de los productos de PCR. Sembrar en cada pocillo 2uL de producto de PCR con 2uL de buffer de siembra. Además, se debe colocar un 0.7 uL marcador de peso molecular de 10pb con 2uL de buffer de siembra. Administrar un voltaje de 150 V por 30 minutos. Realizar la tinción del gel con el protocolo de tinción argéntica usando solución de nitrato de plata. Verificar que las 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 18 µL de Formamida 0.5 µL Marcador GeneScan™ 500 LIZ, por cada muestra, control y muestra blanco a evaluarse. Dispensar 18.5 µL de la mezcla en cada pocillo de la placa. Añadir 1 µL del ADN obtenido en las reacciones de PCR. Denaturalizar las muestras a 98°C por 5 minutos. Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador.

Electroforesis capilar usando Analizador genético SeqStudio™

Una vez preparada la placa, los productos de las reacciones deben ser 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 SCA2 y los electroferogramas obtenidos por cada muestra analizada.

GENOTIPIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE CAG POR TP-PCR

Este procedimiento es complementario a la PCR convencional. Se aplica en casos que



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Dr. Rivas Franchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
Calle P. 1654-A - P.O. Box 1856



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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

Amplificación por TP-PCR usando termociclador Proflex:

Preparar la siguiente mezcla de reacción para una muestra control positiva para SCA2, una muestra control negativa para SCA2, una muestra problema y una muestra blanco:

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

DMSO 4%

Buffer de PCR 1X para enzima taq Long PCR

dNTPs 0.2mM c/u

MgCl₂ 2.3mM

Cebador SCA2-A 0.1M

Cebador SCA2-R2 0.1uM

Cebador SCA2-R1 0.01uM

Enzima Long PCR DNA polimerasa 0.07 U/uL

ADN 0.5ng/uL

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

Visualización de productos de PCR por electroforesis en geles de poliacrilamida

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

Preparación de la placa de fragmentos usando Termociclador Proflex

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

Electroforesis capilar usando el analizador genético SeqStudio™

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

Análisis de resultados

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Prochán
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A.P. 16548 - RNE 1656



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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

FIN



IX. RECOMENDACIONES

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



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neurología
C.A. P. 16543 - RNE 1656



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

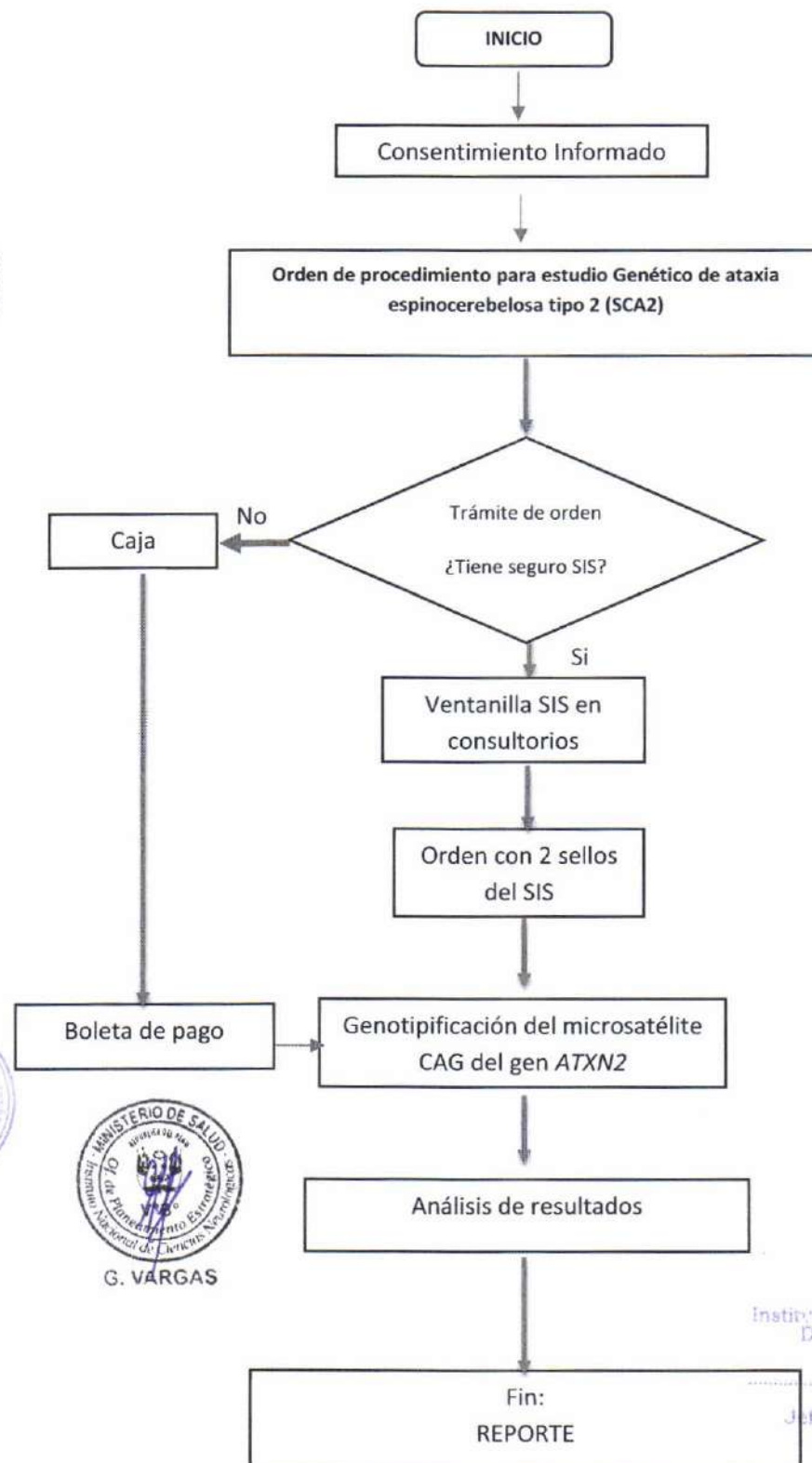


Servicio de Neurogenética

X. ANEXOS

ANEXO 1

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Prauchin
Jefe del Epto. de Neuropatología
Calle P. 1654-B - PNE 1650



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

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

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

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

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

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

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

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

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

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

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

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____



I. TAGLE L.

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

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

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____



P. MAZZETTI S

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo:

DNI:

Fecha y hora:

Firma: _____

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
0000-000000000000

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología

Diána Rivas Frauchin
Jefe del Depto. de Neurología
C.I.P. 16349 - P.V. 16349



PERÚ Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

ANEXO 3

FORMATO DE REPORTE DE RESULTADO PARA PRUEBA GENÉTICA DE SCA2



PERÚ Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Neurogenética



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

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

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

RESULTADO MOLECULAR

Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.

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

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

INTERPRETACIÓN

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

Alelos normales: hasta 31 repeticiones CAG.

Alelos inciertos: rango de 32 repeticiones CAG.

Alelos penetrancia incompleta: rango de 33-34 repeticiones CAG.

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

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

PROCEDIMIENTO

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

CONCLUSIONES

- El resultado excluye/confirma el diagnóstico de Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.
 - Estos resultados deben interpretarse en el contexto de hallazgos clínicos, antecedentes familiares y otros resultados de laboratorio.
 - Todo diagnóstico genético debe ser entregado en una consulta especializada de asesoramiento genético a cargo de un profesional capacitado.
- Figueras-Ildelfonso, E. (2018). Implementación de una metodología basada en las técnicas PCR y TP-PCR para la genotipificación del microsatélite CAG del gen *ATXN2* asociado con ataxia espinocerebelosa tipo 2 en el Centro de Investigación Básica en Neurogenética.
 - Sequeiros, J., Seneca, S., & Martindale, J. (2010). Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of spinocerebellar ataxias. *European Journal of Human Genetics*, 18(11), 1188-1195.

Fecha de entrega de reporte a paciente:



A. CARRASCO



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S



G. VARGAS

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

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Jr. Ancash N° 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

Diana Rivas Prachtin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.I.P. 16548 - RNE 9350



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

ANEXO 4**PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA PRUEBA GENÉTICA PARA SCA2****Poliacrilamida 21%**

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

**TBE 10X**

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

**TBE 1X**

TBE 10x	100 mL
Agua tridestilada	900 mL

Poliacrilamida 6% (V=18 mL)

Poliacrilamida 21%	5.2 mL
TBE 10x	1.8 mL
Agua tridestilada	11 mL
APS 10%	150 uL
TEMED	15 uL

**Poliacrilamida 10% (V=18 mL)**

Poliacrilamida 21%	8.6 mL
TBE 10x	1.8 mL
Agua tridestilada	7.6 mL
APS 10%	150 uL
TEMED	15 uL



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Kivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A. P. 16548 - RNP 1206



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

Ladder de 10pb

Ladder de 10pb	2 uL
Agua tridestilada	8 uL

Mix de cebadores SCA2-PCR 20uM

2A (100uM)	10 uL
2B (100uM)	10 uL
Agua ultrapura	30 uL

Mix de dNTPs 10mM (2.5mM c/u)

Adenina – A (100 mM)	2.5 uL
Timina – T (100 mM)	2.5 uL
Guanina – G (100 mM)	2.5 uL
Citosina – C (100 mM)	2.5 uL
Agua ultrapura	90 uL

Soluciones de Tinción argéntica

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

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

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



A. CARRASCO



G. VARGAS



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

.....
Diana Rivas Frauchiger
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.I. P. 16549 - PNE 1997



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Figueroa-Ildefonso, E. (2018). Implementación de una metodología basada en las técnicas PCR y TP-PCR para la genotipificación del microsatélite CAG del gen ATXN2 asociado con ataxia espinocerebelosa tipo 2 en el Centro de Investigación Básica en Neurogenética
2. Pulst, S. M. (1993). Spinocerebellar Ataxia Type 2. En M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. Stephens, & A. Amemiya (Eds.), GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1275/>
3. Pulst, S. M., Nechiporuk, A., Nechiporuk, T., Gispert, S., Chen, X. N., Lopes Cendes, I., Sahba, S. (1996). Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genetics*, 14(3), 269-276. <https://doi.org/10.1038/ng1196-269>
4. Sequeiros, J., Martindale, J., & Seneca, S. (2010). EMQN Best Practice Guidelines for molecular genetic testing of SCAs. *European Journal of Human Genetics*, 18(11), 1173-1176. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.8>
5. Sequeiros, J., Seneca, S., & Martindale, J. (2010). Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of spinocerebellar ataxias. *European Journal of Human Genetics*, 18(11), 1188-1195. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.10>
6. Vinther-Jensen, T., Ek, J., Duno, M., Skovby, F., Hjermand, L. E., Nielsen, J. E., & Nielsen, T. T. (2013). Germ-line CAG repeat instability causes extreme CAG repeat expansion with infantile-onset spinocerebellar ataxia type 2. *European Journal of Human Genetics*: EJHG, 21(6), 626-629. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.231>
7. Sun Y-M, Lu C, Wu Z-Y. Spinocerebellar ataxia: relationship between phenotype and genotype - a review. *Clin Genet*. 2016 Oct;90(4):305-14. doi: 10.1111/cge.12808. Epub 2016 Jun 30.



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de NeuropatologíaDiana Kivas Prachtin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.I. P. 16563 - PNE-155



5 - PRUEBA GENÉTICA PANEL DE ATAXIAS HEREDITARIAS (SCAS)

I. FINALIDAD

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

II. OBJETIVO

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

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

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

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

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



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S



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

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

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

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

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

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

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



A. CARRASCO



G. VARGAS



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A. P. 16548 - RND 1456



6.2.2. Material de plástico

- Micropipetas 10 µL, 20 µL, 100 µL y 200 µL.
- Tips con filtro 10 µL, 20 µL, 100 µL y 200 µL.
- Tubos de PCR de tapa plana 0.2 mL
- Tubos de PCR de tapa cónica 0.2 mL
- Microamp™ 8-Tube Strip, 0.2mL
- Microamp™ 8-Cap Strip
- Tubos de 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
- Soporte para micropipetas
- Septa for 0.2 mL MicroAmp tubes
- Cathode Buffer Container Reservoir Septa for SeqStudio Genetic Analyzer



6.2.3. Otros materiales

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



I. TAGLE L.

6.2.4. Equipos

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



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Kivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A.P. 16548 - PNE 2436



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

6.2.5. Software

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

6.3. SERVICIOS

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



VII.

CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

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

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

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



G. VARGAS

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M.P. 16548 - Lima, Perú



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

Preparación de mix de PCR y de TP-PCR:

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

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

Preparación de placa de fragmentos:

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

Electroforesis capilar

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

*Análisis de resultados*Resultados de PCR

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



L. TAGLE L.



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

David Iovas Frauchin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.I. P. 15548 - PNE 7536



A. CARRASCO



G. VARGAS



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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



IX. RECOMENDACIONES

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



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Kivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A. P. 16548 - RNE 7356



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

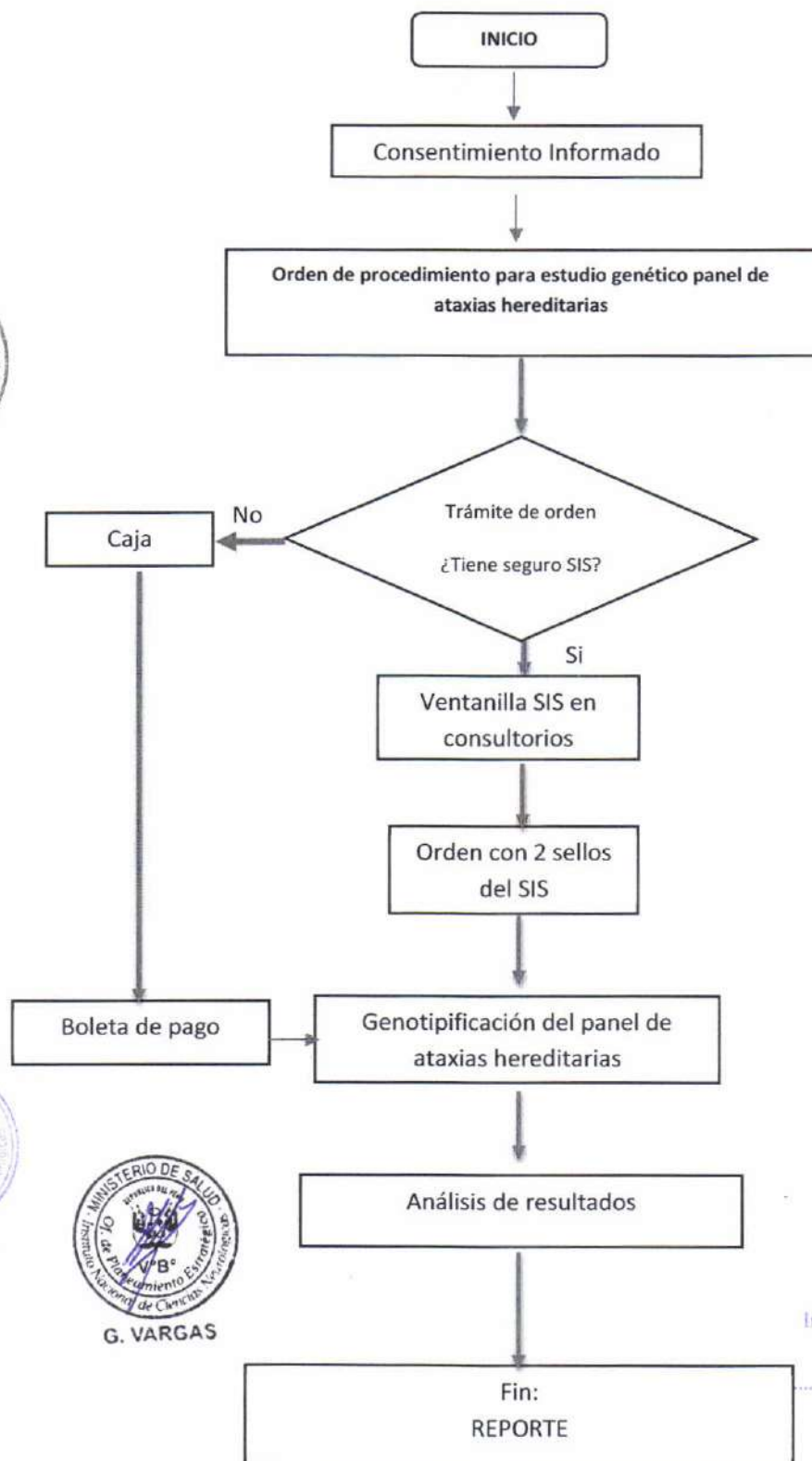


Servicio de Neurogenética

X. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PANEL DE ATAXIAS HEREDITARIAS



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Nivas Franchin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 165-8 - PNE V556



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

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

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

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

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

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

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

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

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

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

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

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

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

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo:

DNI:

Fecha y hora:

Firma: _____

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incn.gob.pe



G. VARGAS

J. Arceval N°1271 Lima Cercado, Perú
Teléfono +51 1 411 7770
Email: info@icbneurogenetica.org.pe

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diána Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.I.N.P. 16545 - RNE 7456



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

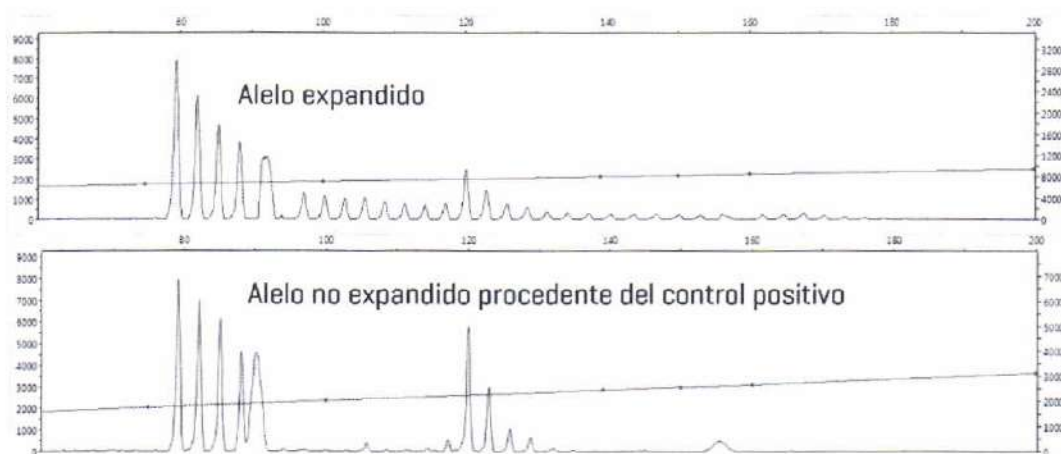


Servicio de Neurogenética

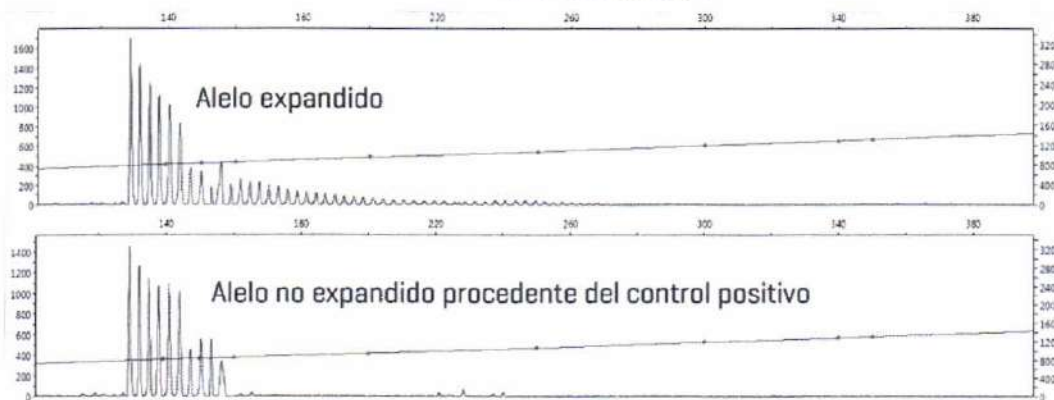
ANEXO 3

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE ELECTROFEROGRAMA DE TP-PCR

TP-PCR PARA SCA2



TP-PCR PARA SCA7



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Kivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A.P. 16548 - PNE 136



ANEXO 4

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



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

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

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

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

RESULTADO MOLECULAR

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

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

INTERPRETACIÓN

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

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

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

PROCEDIMIENTO:

El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *ATXN1* consiste en la amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Utilizando el kit Imagen®SCAs.

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

CONCLUSIONES

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

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

RESULTADO MOLECULAR

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

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

INTERPRETACIÓN

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

Alelos normales: hasta 31 repeticiones CAG.

Alelos inciertos: rango de 32 a 34 repeticiones CAG.

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

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Jr. Ancash N° 1271, Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incn.org.pe

Diana Rivas Franchini
Jefa del Dpto. de Neurogenética
C.O. P. 165-8 - 0412-336



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional de
Ciencias Neurológicas

Neurogenética

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

El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *ATXN2* consiste en amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Utilizando el kit Imegen®SCAs.

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

CONCLUSIONES

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

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

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

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

INTERPRETACIÓN

El diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3) se define por el número de repeticiones CAG del alelo más largo en el gen *ATXN3*:

Alelos normales: hasta 44 repeticiones CAG.

Alelos penetrancia intermedia: rango de 45 a 59 repeticiones CAG.

Alelos de penetrancia completa, patológico: A partir de 60 o más repeticiones CAG.

PROCEDIMIENTO

El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *ATXN3* consiste en amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Utilizando el kit Imegen®SCAs.

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

CONCLUSIONES:

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

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

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

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

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

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

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.A. 16648 - RND 7856



I. TAGLE L.



B. MAZZETTI S



A. CAPRASSO



G. VARGAS



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada - en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional de
Ciencias Neurológicas

Neurogenética

INTERPRETACIÓN

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

Alelos normales: hasta 18 repeticiones CAG.

Alelos penetrancia intermedia: 19 repeticiones CAG.

Alelos de penetrancia completa: A partir de 20 o más repeticiones CAG.

PROCEDIMIENTO

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

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

CONCLUSIONES:

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

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

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

Alelo 1: repeticiones CAG.

Alelo 2: repeticiones CAG.

INTERPRETACIÓN

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

Alelos normales: hasta 19 repeticiones CAG.

Alelos inciertos: rango de 28 a 33 repeticiones CAG.

Alelos de penetrancia intermedia: rango de 34 a 35 repeticiones CAG.

Alelos de penetrancia completa: A partir de 36 a más repeticiones CAG.

PROCEDIMIENTO

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

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

CONCLUSIONES:

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

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

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



G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Dr. KIVAS FRANCHINI
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A. 16503 - 17427356



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional de
Ciencias Neurológicas

Neurogenética

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

Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.

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

Alelo 1: repeticiones CAG.

Alelo 2: repeticiones CAG.

INTERPRETACIÓNEl diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 12 (SCA12) se define por el número de repeticiones CAG del alelo más largo en el gen *PPP2R2B*.**Alelos normales:** hasta 32 repeticiones CAG.**Alelos incierto:** rango de 40 a 45 repeticiones CAG.**Alelos de penetrancia completa:** A partir de 51 o más repeticiones CAG.**PROCEDIMIENTO**El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *PPP2R2B* consiste en amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Utilizando el kit Imegen®SCAs.La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1 , los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.**CONCLUSIONES:**

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

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

Presencia de alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.

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

Alelo 1: repeticiones CAG.

Alelo 2: repeticiones CAG.

INTERPRETACIÓNEl diagnóstico molecular de la ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17) se define por el número de repeticiones CAG del alelo más largo en el gen *TBP*.**Alelos normales:** hasta 40 repeticiones CAG.**Alelos de penetrancia intermedia:** rango de 41 a 48 repeticiones CAG.**Alelos de penetrancia completa:** A partir de 49 o más repeticiones CAG.**PROCEDIMIENTO**El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *TBP* consiste en amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Utilizando el kit Imegen®SCAs.La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1 , los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.**CONCLUSIONES:**

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

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

Jr. Ancash N° 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incn.org.pe



G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.I.B. 16545 - J.N.E. 1656



I. TAGLE L.



P. MAZZATTI S



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional de
Ciencias Neurológicas

Neurogenética

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

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

RESULTADO MOLECULAR

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

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

INTERPRETACIÓN

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

Alelos normales: hasta 35 repeticiones CAG.

Alelos inciertos: rango de 36 a 47 repeticiones CAG.

Alelos de penetrancia completa: A partir de 48 o más repeticiones CAG.

PROCEDIMIENTO

El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones CAG del gen *ATN1* consiste en amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones CAG por electroforesis capilar con marcador de peso molecular. Utilizando el kit Imegen@SCAs.

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

CONCLUSIONES:

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



A. CARRASCO

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

Jr. Ancash N° 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incnngen.org.pe



G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A.P. 16548 - PNE 1656



XI. BIBLIOGRAFÍA

1. SCA Base. Reference ranges for oligonucleotide repeat sizes at main SCA loci.
<http://www.scabase.eu/table3.php>
2. Toyoshima Y, Onodera O, Yamada M, et al. Spinocerebellar Ataxia Type 17. 2005 Mar 29 [Updated 2012 May 17]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1438/>
3. Veneziano L, Frontali M. DRPLA. 1999 Aug 6 [Updated 2016 Jun 9]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1491/>
4. Sun Y-M, Lu C, Wu Z-Y. Spinocerebellar ataxia: relationship between phenotype and genotype - a review. Clin Genet. 2016 Oct;90(4):305-14. doi: 10.1111/cge.12808. Epub 2016 Jun 30.



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Frauchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.A. P. 16549 - BNE 7650



6 - PRUEBA GENÉTICA PARA DISTONÍA TIPO DYT1

I. FINALIDAD

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

II. OBJETIVO

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

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

CPT: 81418 - PRUEBA GENÉTICA PARA DISTONÍA TIPO DYT1

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

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

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

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

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Médica, de Neuropatología
DNF 10.54



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S



I. TAGLE L.



- 01 médico genetista.

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

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

6.2.2. Reactivos químicos

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

6.2.3. Material de plástico

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

6.2.4. Material de vidrio

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



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



P. MAZZETTI S



G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Elvira Rojas Prachtin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.M. P. 15549 - PNP 15549



Servicio de Neurogenética

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

6.2.5. Otros materiales

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

6.2.6. Equipos

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

6.2.7. Software

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

6.3. SERVICIOS

- Servicios de agua
- Servicio de luz



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropsiología

Elisa Livia Franchini
Jefa del Depto. de Neuropsiología
C.I. 21 155-8 - 21 157 7556



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Ninguna.

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

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



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S



A. CARRASCO



G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de NeuropatologíaDiana Karla Peralta
Jefe del Dept. de Neuropatología
C.B. P. 16549 - 11402 735



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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



IX. RECOMENDACIONES

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



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S

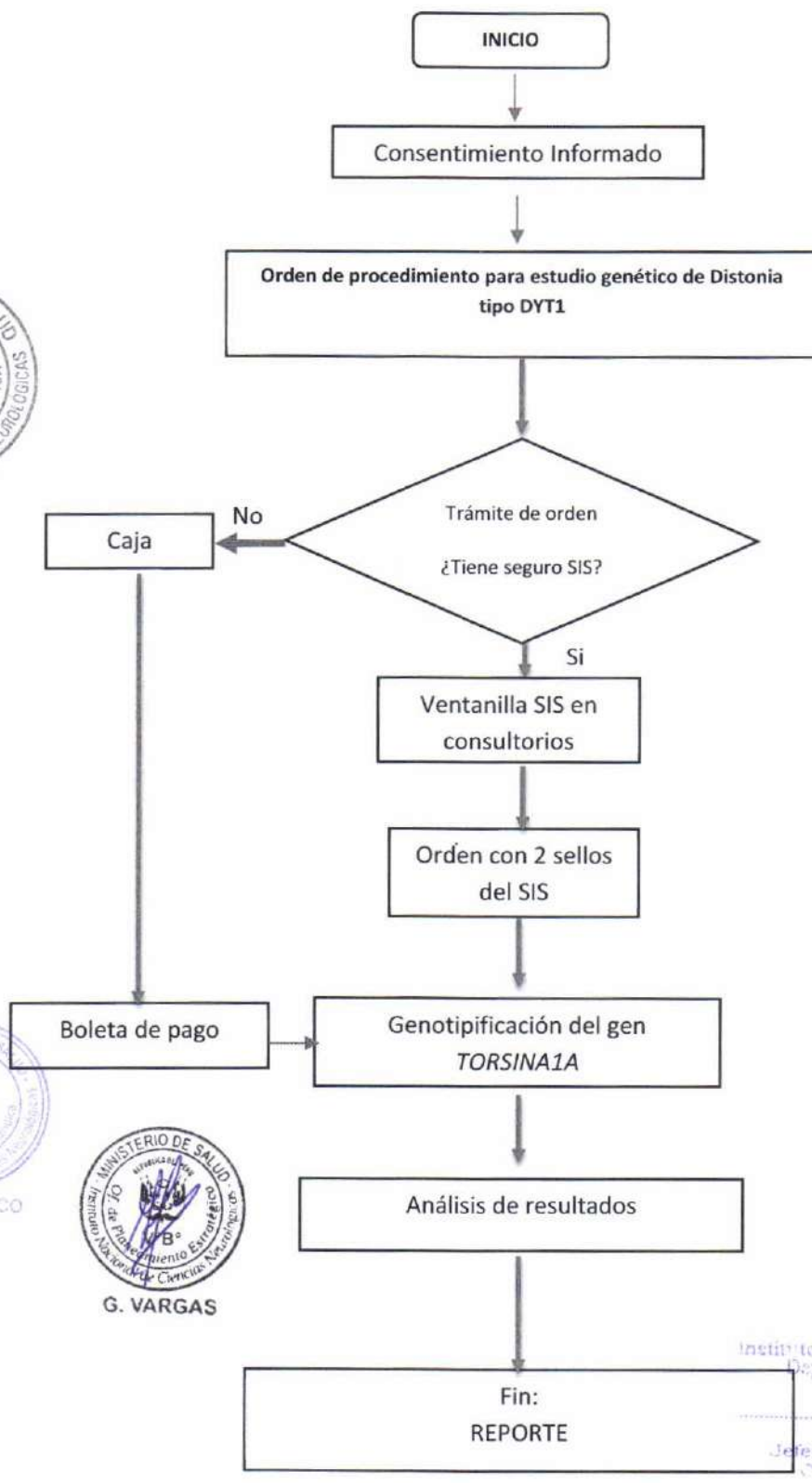
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Kivas Frauchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.A. P. 16548 - 1997

X. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA PARA DISTONIA DYT1





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

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

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

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

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

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

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

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

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

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

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

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

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

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo:

DNI:

Fecha y hora:

Firma: _____

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incn.gob.pe

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Nolas Franchini
Jefe del Cpto. de Neuropatología
C.A. 16548 - PNE 155



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

ANEXO 3

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



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional de
Ciencias Neurológicas

Neurogenética

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

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

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

RESULTADO MOLECULAR

NO/DETECTA la variante patogénica "904_906delGAG/907_909delGAG" en el gen *TOR1A*, debido a que se evidencia fragmentos en el rango de 50pb a 150pb

INTERPRETACIÓN

La presencia de la variante patogénica "904_906delGAG/907_909delGAG" en al menos uno de los alelos está asociada a la Distonía Primaria DYT1 hasta en el 30% de los portadores de esta mutación y por la técnica utilizada la interpretación es la siguiente:

Genotipo normal: se evidencia dos fragmentos en el rango de 50pb a 150pb.**Genotipo con la variante patogénica "904_906delGAG/907_909delGAG":** se evidencia la presencia de ≥ 3 fragmentos en el rango de 50pb a 150pb.

PROCEDIMIENTO

El estudio molecular para genotipificación de la variante patogénica "904_906delGAG/907_909delGAG" en el gen *TOR1A* consiste en amplificación por PCR en tiempo final, seguido de análisis de fragmentos de longitud polimórfica (RFLP) en gel de poliácridamida e interpretación del número de fragmentos.

CONCLUSIONES

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

Fecha de entrega de reporte a paciente:

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.peJr. Ancash N° 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7279
Correo electrónico: informes@incngen.org.peElena Nolas Freuchen
Jefe del Cpto. de Neurogenética
C.R. 1554-3 - EXT. 7636



ANEXO 4

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA PRUEBA GENÉTICA DE DISTONIA TIPO DYT1



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

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



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

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



L. TAGLE L.

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



A. CARRASCO



P. MAZZETTI S

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



G. VARGAS

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropsicología

Diana Rivas Franchina
Jefe del Dpto. de Neuropsicología
C.I.P. 16548 - INE 7356



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

Agua ultrapura	90 uL
----------------	-------

Soluciones de Tinción argéntica

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

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

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



A. CARRASCO



G. VARGAS



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Kivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.R.P. 16543 - RNE 1446



XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Albanese, A., et. al. (2011). EFNS guidelines on diagnosis and treatment of primary dystonias. European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies, 18(1), 5-18.
2. Fahn, S. (2011). Classification of movement disorders. Movement Disorders, 26(6), 947-957.
3. Ozelius, L. J., et. al. (1997). The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. Nat Genet, 17(1), 40-48.



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Nieves Frauchin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.I.P. 15548 - RNP - 50



7 - PRUEBA GENÉTICA PARA Distrofia Muscular de Duchenne por MLPA

I. FINALIDAD

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

II. OBJETIVO

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

ÁMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO

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

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

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

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Diagnóstico y Patología
Dr. Rivas Franchini
del Depto. de Neurop. II
16.000 DVE





PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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



VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

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

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

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



I. TAGLE L.

6.2.2. Reactivos químicos

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



P. MAZZETTI S

6.2.3. Material de plástico

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

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.I.N. P. 15548 - 33427358



A. CARRASCO



G. VARGAS



Servicio de Neurogenética

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



6.2.4. Material de vidrio

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

6.2.5. Otros materiales

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



6.2.6. Equipos

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

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Alvarado Franchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.O. P. 16549 - P.N. 16550



Servicio de Neurogenética

- Sistema de documentación de geles OmniDoci (Clever Scientific)
- Cabina de PCR (ESCO®)
- Cámara de electroforesis horizontal 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)
- Microondas
- Picoentrífuga
- Vórtex
- Cronómetro
- Computadoras de escritorio
- Impresora
- Sistema de alimentación eléctrica ininterrumpida
- Estabilizador

6.2.7. Software

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

6.3. SERVICIOS

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

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

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

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCEDIMIENTO

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



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de NeuropatologíaDiana Rivas Frauchiger
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.A.P. 16549 - F.V. 1458



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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



IX. RECOMENDACIONES

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología

Glenn Rivas Frauchini
Jefe del Depto. de Neurología
C.A. P. 16568 - Lima, Perú



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

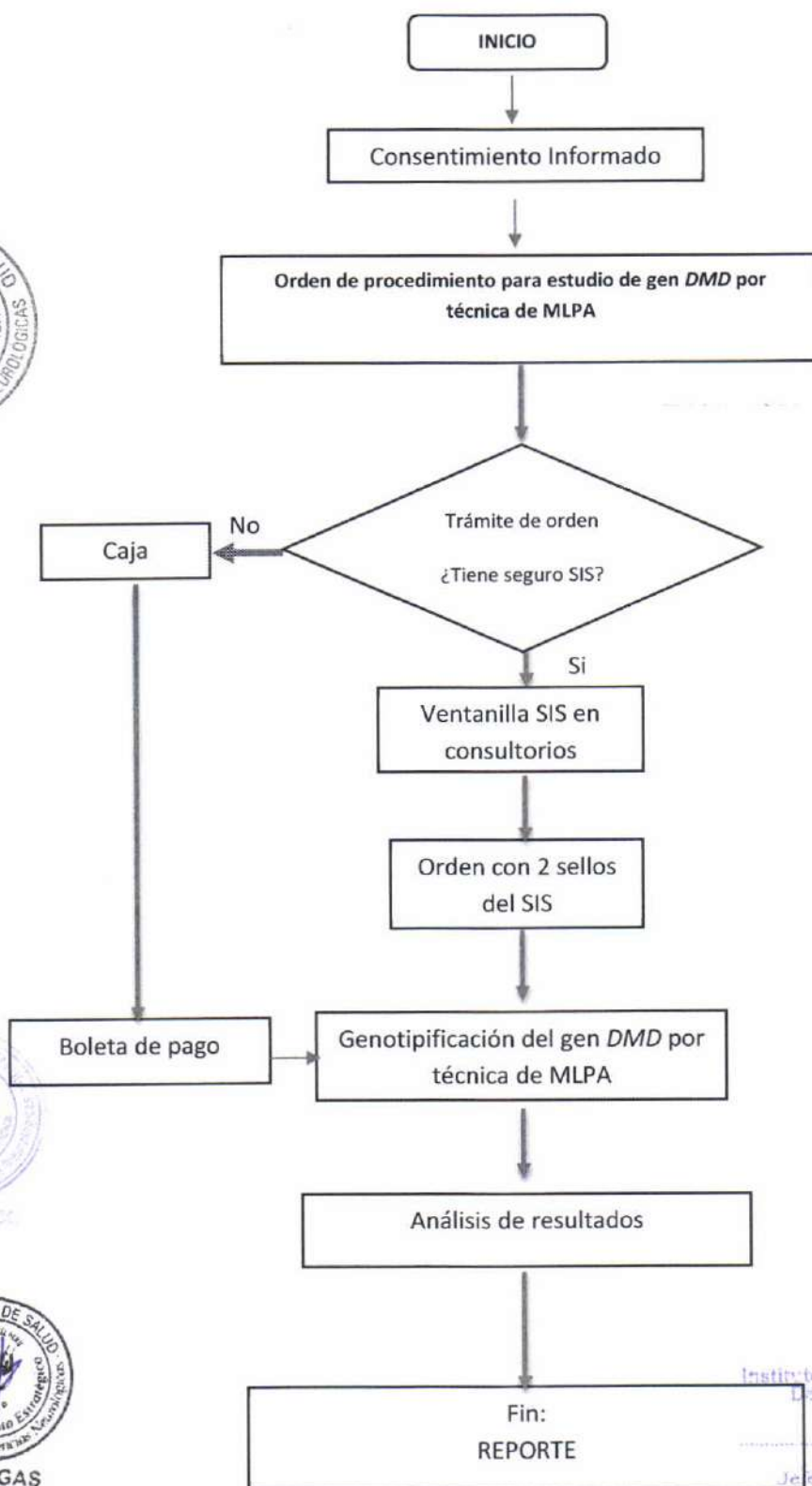


Servicio de Neurogenética

X. ANEXOS

ANEXO 1

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Blanca Rivas Frauchin
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.A. P. 16548 - RNE 7456



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

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

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

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

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

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

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

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

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

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

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

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

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

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo:

DNI:

Fecha y hora:

Firma: _____

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incn.gob.pe

Av. Arce 1512, 15121 Lima Cercado, Perú
Teléfono: (01) 421 1131
Email: info@incn.gob.pe
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diego Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.I.B. 01.16548 - PNE 3556





PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

ANEXO 3

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE MLPA

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

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



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de NeuropatologíaDiana Rivas Fraachin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.R. 16848 - RNP 7556



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

ANEXO 4

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

PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Neurogenética

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

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

RESULTADO MOLECULAR

INTERPRETACIÓN

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

Perfil normal: Los varones no afectados presentan un DQ de 1.

Perfil duplicación: Los varones que presentan una duplicación en algún segmento del gen *DMD* presentan un DQ de 2.

Perfil deleción: Los varones que presentan una deleción en algún segmento del gen *DMD* presentan un DQ de 0.

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

Perfil normal: Las mujeres no afectadas presentan un DQ de 2.

Perfil deleción en heterocigosis: Las mujeres que presentan una deleción en algún segmento del gen *DMD* presentan un DQ de 1.

Perfil duplicación en heterocigosis: Las mujeres que presentan una duplicación en algún segmento del gen *DMD* presentan un DQ de 3.

Perfil triplicación en heterocigosis: Las mujeres que presentan una triplicación en algún segmento del gen *DMD* presentan un DQ de 4.

PROCEDIMIENTO

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

CONCLUSIONES

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



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

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Jr. Ancash N° 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@innngen.org.pe

Diana Kivas Franchin
Jefe del Epto. de Neurología
C.A. P. 15548 - 00000000



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

ANEXO 5**PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ESTUDIO DE GEN *DMD* POR TÉCNICA DE MLPA**

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



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

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

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de NeuropatologíaDiana Rivas Pranchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.O. P. 1554-A - DNE 1555



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Aartsma-Rus, A., Ginjaar, I. B., & Bushby, K. (2016). The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, 53(3), 145-151.
2. Abbs, S., Tuffery-Giraud, S., Bakker, E., Ferlini, A., Sejersen, T., & Mueller, C. R. (2010). Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, 20(6), 422-427.
3. Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., Case, L. E., Clemens, P. R., Cripe, L. Constantin, C. (2010a). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet Neurology*, 9(1), 77-93.
4. Hutton, E. M., & Thompson, M. W. (1976b). Carrier detection and genetic counselling in Duchenne muscular dystrophy: a follow-up study. *Canadian Medical Association Journal*, 115(8), 749-752.
5. Mah, J. K. (2016). Current and emerging treatment strategies for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 12, 1795-1807.



A. CARRASCO



G. VARGAS



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Dr. Juan Francisco
Jefe del Dept. de Neuropatología
C.A. P. 16549 - F.V. 16556



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

I. FINALIDAD

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

II. OBJETIVO

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

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO

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

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

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

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología

Juan Rivas Franchin
Jefe del Dpto. de Neuropatías Hereditarias
16512 - RNE-2015



A. CARRASCO



G. VARGAS



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S



VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

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

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

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

6.2.2. Reactivos químicos

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

6.2.3. Material de plástico

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada
Dr. Carlos Franchini
Jefe del Depto. de Neurología y Neuropsiquiatría
Calle P. 1652 - PNE 2556

**6.2.4. Material de vidrio**

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

6.2.5. Otros materiales

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

6.2.6. Equipos

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



A. CARRASCO



G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Kivas Frauchin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A. 16548 - 16549



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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

6.2.7. Software

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

6.3. SERVICIOS

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

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

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

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCEDIMIENTO

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO				
N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
INICIO				
1	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO	Documento de Consentimiento Informado firmado	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
2	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
3	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO <i>Preliquidación</i> Solicitar la preliquidación del procedimiento	Sello de Preliquidación	Oficina de Preliquidación	Contabilidad
	<i>Liquidación</i> Liquidar el costo del procedimiento	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 -20 ng/μL	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética
7	PROTOCOLO DE GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN <i>PMP22</i> <i>Denaturación de ADN</i>	Análisis del número variable de copias (CNV) gen <i>PMP22</i>	Laboratorio de Neurogenética	Servicio de Neurogenética





PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

Etiquetar strips de 0.2 mL y agregar 5 uL de ADN (10-20ng/uL). Colocar en el termociclador y ejecutar el programa siguiente: Denaturación inicial a 98°C por 5 minutos, mantener a 25°C.

Reacción de hibridización

Preparar el master mix para la reacción de hibridización (para cada reacción): 1.5 uL de Buffer MLPA + 1.5 uL del mix de pruebas. Homogenizar usando vórtex. Agregar 3uL del master mix de hibridización a cada reacción. Homogenizar por pipeteo. Continuar con el siguiente programa: Reacción de Hibridización a 95°C por 1 minuto y 60°C por 16-20 horas.

Reacción de Ligamiento

Preparar el master mix de Ligasa: Para cada reacción, 25uL de agua ultrapura, 3uL de Buffer A de Ligasa, 3uL de Buffer B de Ligasa y 1uL de Enzima Ligasa-65. Homogenizar por pipeteo. Colocar las muestras a 54°C y agregar 32uL del master mix Ligasa a cada reacción y homogenizar por pipeteo. Continuar con el siguiente programa: 54°C por 15 minutos, 98°C por 5 minutos y mantener a 20°C.

Reacción de PCR

Preparar el master mix de polimerasa. Agregar 7.5uL de agua ultrapura, 2uL de cebadores SALSA y 0.5uL de polimerasa SALSA. A temperatura ambiente, agregar 10uL de master mix de polimerasa a cada reacción. Mezclar por pipeteo. Continuar con el programa: 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos; 72°C por 20 minutos y mantener a 15°C.

Preparación de placa de fragmentos

En una placa compatible con el equipo proceder con los siguientes pasos: Preparar una mezcla de 12 µL de Formamida 0.8 µL Marcador GeneScan™ 500 LIZ, por cada muestra a evaluarse. Dispensar 12 µL de la mezcla en cada pocillo de la placa. Añadir 0.8 µL del ADN. Denaturalizar las muestras a 98°C por 5 minutos. Guardar la placa a 4°C hasta introducirla al analizador.

Electroforesis capilar

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

Análisis de resultados

Empleando el programa Coffanalyzer, analizar el DQ (cantidad de dosis) de los fragmentos generados (anexo 1).

9	REGISTRO Y REPORTE DE PROCEDIMIENTO • Registrar "Reporte de laboratorio a disposición" en base de datos "Genotipificaciones".	Información registrada en base de datos y Reporte de genotipificación para gen PMP22	Laboratorio de Neurogenética	de Servicio de Neurogenética	de
---	---	--	------------------------------	------------------------------	----

FIN

Diana Rivas Franchini
Jefe del Dpto. de Neurogenética
C.R. 2.165/R - PNE 2556



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

IX. RECOMENDACIONES

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



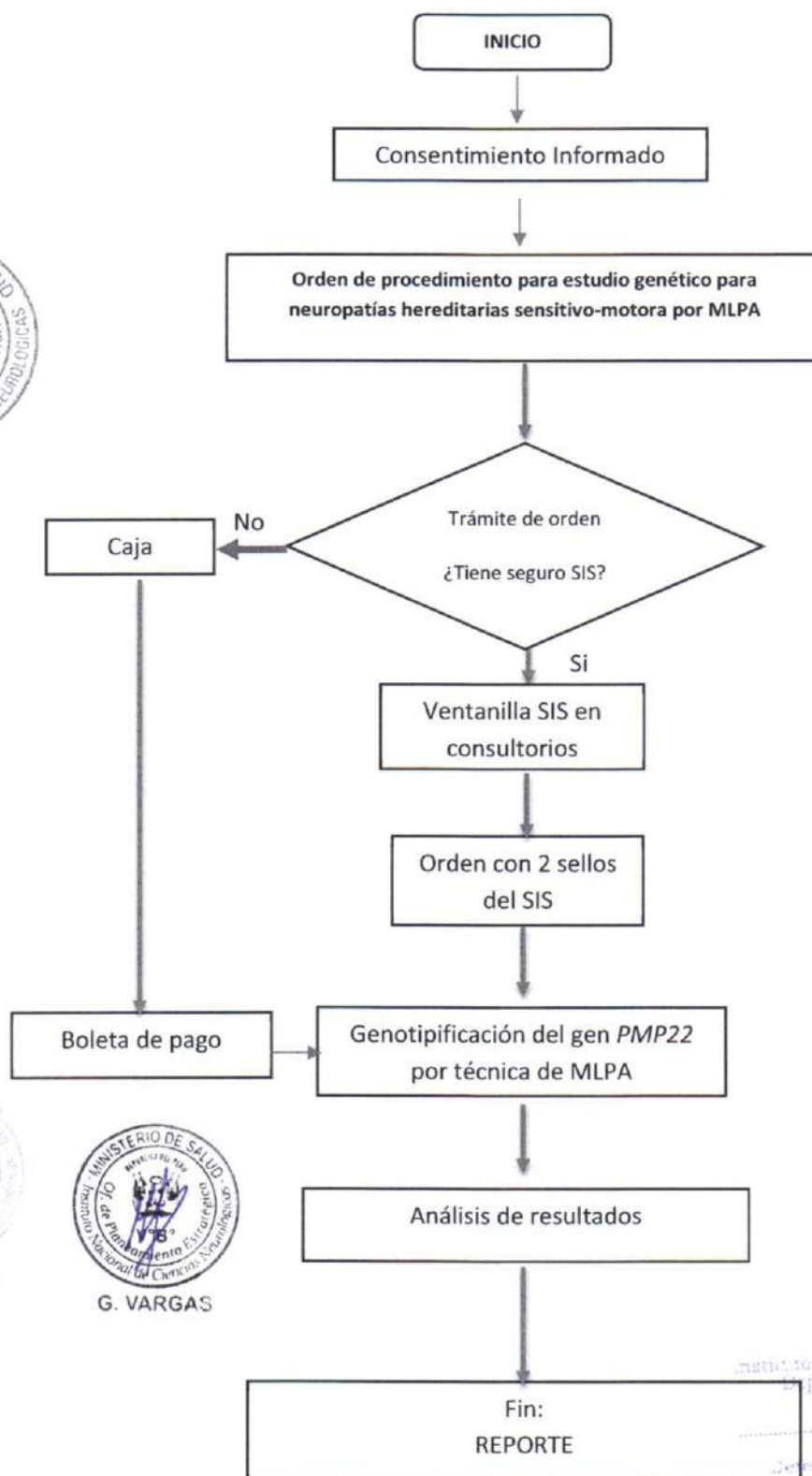
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

.....
Diana Rivas Franchin
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.I. P. 16564 - DNI 77656



X. ANEXOS

ANEXO 1

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



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

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

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

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

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

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

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

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

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

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

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

Nombre completo:

DNI:

Firma:

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

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

Nombre completo:

DNI:

Firma:

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo:

DNI:

Fecha y hora:

Firma:

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incn.gub.pe

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Frauchin
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.A. P. 16548 - PNE 16548



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

ANEXO 3

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE MLPA

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



A. CARRASCO



G. VARGAS



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.R. 1684



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

ANEXO 4

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

PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional de
Ciencias Neurológicas

Neurogenética

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

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

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

RESULTADO MOLECULAR

Presencia de un alelo con DELECIÓN/DUPLICACIÓN de la región

Presencia de ambos alelos sin alteraciones.

INTERPRETACIÓN

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

PROCEDIMIENTO:

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



G. VARGAS



P. MAZZETTI S

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

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

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Jr. Ancash N° 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

Diana Kwas Franchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.O. 2.155-8 - 2007



ANEXO 5

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

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

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

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Elvira Franchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.R. 2.457.944



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Schouten JP et al. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 30:e57.
2. Schwartz M et al. (2007). Deletion of exon 16 of the dystrophin gene is not associated with disease. *Hum Mutat.* 28:205.
3. Varga RE et al. (2012). MLPA-based evidence for sequence gain: pitfalls in confirmation and necessity for exclusion of false positives. *Anal Biochem.* 421:799-801.
4. Weterman et al. (2010). Copy number variation upstream of PMP22 in Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet.* 18(4):421-428.
5. Zhang et al. (2010). Mechanisms for Nonrecurrent genomic rearrangements associated with CMT1A or HNPP: rare CNVs as a cause for missing heritability. *Am J Hum Genet.* 86:892-903.
6. Brown SB et al. (2014). Point Mutation Analysis of PMP22 in Patients Referred for Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies. *Open J Genet.* 4(6):426-433.
7. Gui B et al. (2016). A new next-generation sequencing-based assay for concurrent preimplantation genetic diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and aneuploidy screening. *J Genet Genomics.* 43(3):155-159.
8. Milley GM et al. (2018). Genotypic and phenotypic spectrum of the most common causative genes of Charcot-Marie-Tooth disease in Hungarian patients. *Neuromuscul Disord.* 28(1):38-43.
9. Shahrizaila N et al. (2014). X-linked Charcot-Marie-Tooth disease predominates in a cohort of multiethnic Malaysian patients. *Muscle Nerve.* 49(2):198-201.
10. Wang R et al. (2015). Clinical and genetic spectra in a series of Chinese patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Clin Chim Acta.* 451 (pt B):263-270.



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.A. P. 1564 R. - 00111 - 15



9 - PRUEBA GENÉTICA PARA ATAXIA DE FRIEDREICH

I. FINALIDAD

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

II. OBJETIVO

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

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

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

IV. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR

CPT: 81479 - PRUEBA GENÉTICA DE ATAXIA DE FRIEDREICH

V. CONSIDERACIONES GENERALES

5.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

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

5.2. CONCEPTOS BÁSICOS

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

VI. REQUERIMIENTOS BÁSICOS

6.1. RECURSOS HUMANOS

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



Dr. Rivas Franchini
Dir. Ejec. de Neurogenética



A. CARRASCO



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S



G. VARGAS



Servicio de Neurogenética

- 01 médico neurólogo.
- 01 médico genetista.

6.2. MATERIALES

6.2.1. Implementos moleculares

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

6.2.2. Material de plástico

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

6.2.3. Otros materiales

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

6.2.4. Equipos

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



I. TAGLE L.



P. MAZZETTI S.



A. CARRASCO



G. V.

IS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Ayres Franco
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.A. 16588



Servicio de Neurogenética

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

6.2.5. Software

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

6.3. SERVICIOS

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

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

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

VIII. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO

N°	ACTIVIDAD	PRODUCTO	RESPONSABLE	UNIDAD ORGÁNICA
INICIO				
1	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO	Documento de Consentimiento Informado firmado	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
2	EMITIR ORDEN DE PROCEDIMIENTO	Orden de procedimiento	Área Clínica	Servicio de Neurogenética
3	TRÁMITE DE ORDEN DE PROCEDIMIENTO <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	Oficina de Preliquidación Ventanilla CAJA Ventanilla SIS	Contabilidad Contabilidad SIS
4	REGISTRAR LOS DATOS DEL PACIENTE	Información registrada en base	Área Clínica	Servicio de Neurogenética



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

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

FIN



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



P. MAZZETTI S



G. VARGAS

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurogenética
Diana Rivas Frauchin
Jefe del Depto. de Neurogenética
C.A. P. 1558-B - PNE 1356



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

IX. RECOMENDACIONES

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



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

.....
Eduardo Rivas Frauchini
Jefe del Dpto. de Neuropatología
C.E. P. 16548 - PNE 1655



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

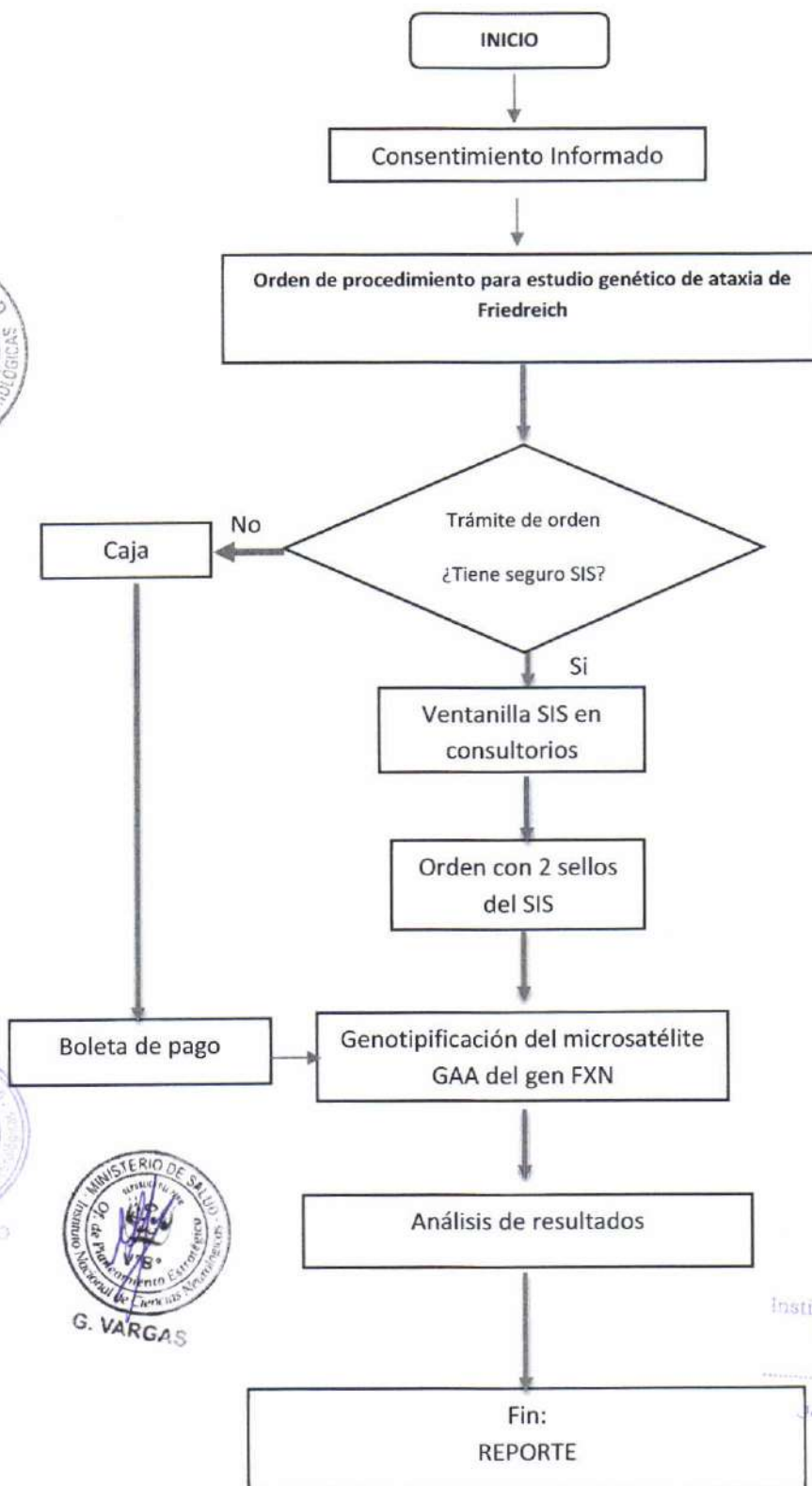


Servicio de Neurogenética

X. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA GENÉTICA DE ATAXIA DE FRIEDREICH



Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.I. D. 15548 - 04470550



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética

ANEXO 2

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA

HC:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE ESTUDIO GENÉTICO

¿Qué procedimiento es necesario para realizar el estudio genético?

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

¿Cuáles son los beneficios del estudio genético?

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

¿Cuál puede ser el resultado del estudio?

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

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

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

DECLARACIÓN DEL SOLICITANTE

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

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

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

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

Nombre completo:

DNI:

Firma: _____

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Nombre completo:

DNI:

Fecha y hora:

Firma: _____

Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incn.gob.pe

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neurología

Dr. Juan Carlos Francisco
Jefe del Depto. de Neurología
C.B. F. 1654-8 - PNE 0556



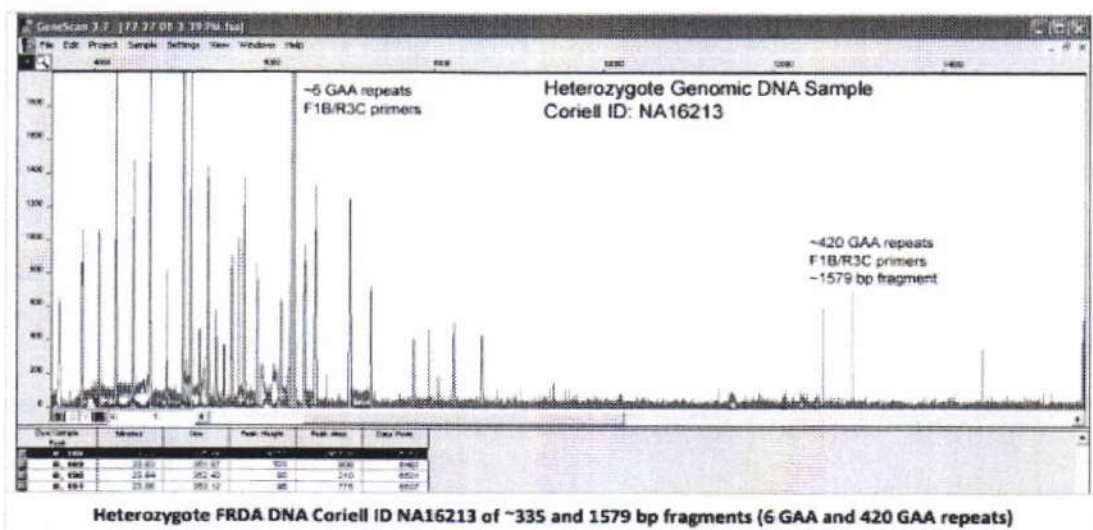
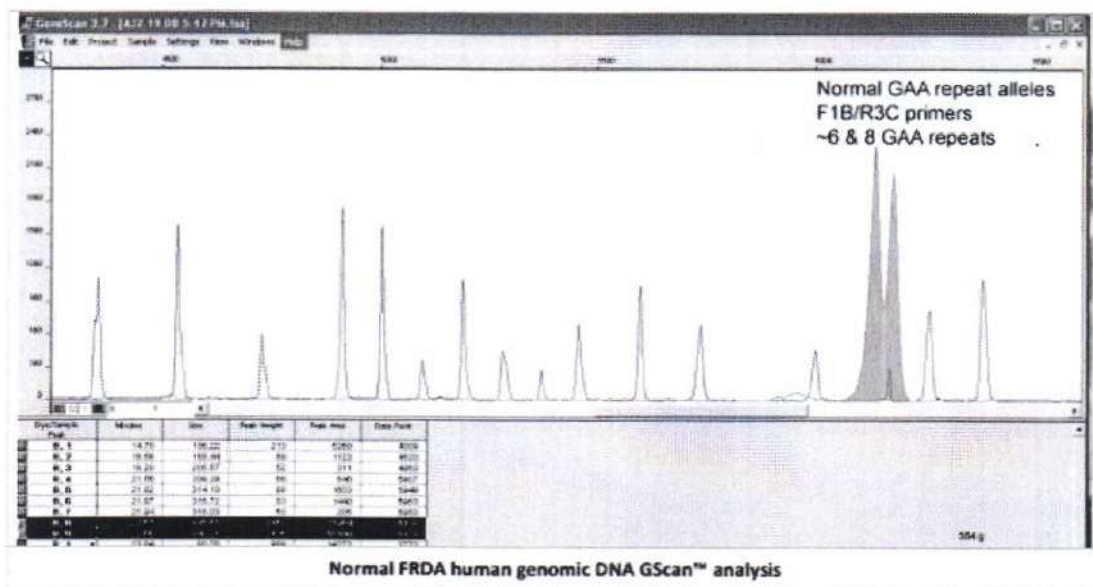
PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

ANEXO 3

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE ELECTROFEROGRAMA DEL GEN FXN

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología



PERÚ

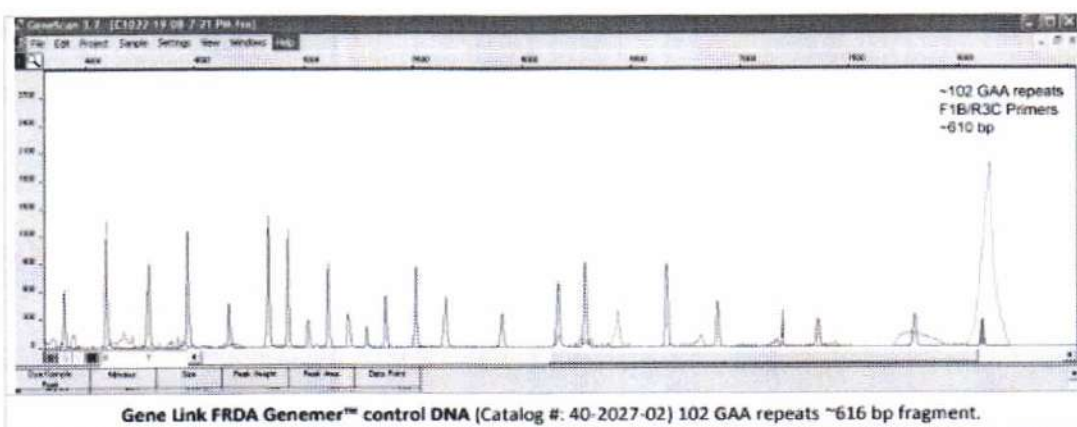
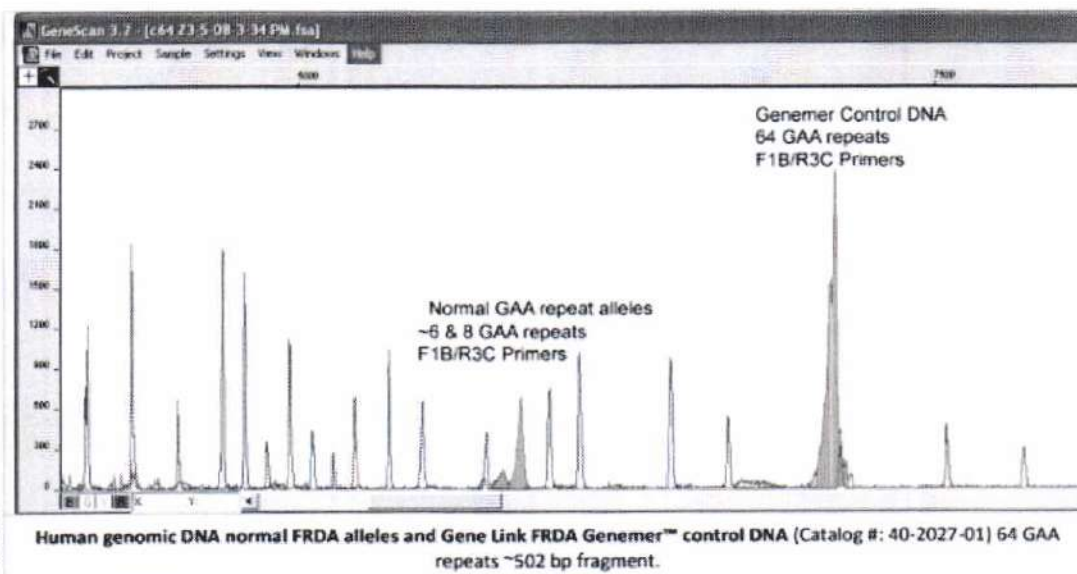
Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas

Dirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento



Servicio de Neurogenética



I. TAGLE L.



A. CARRASCO



G. VARGAS



P. MAZZETTI S

Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropsiquiatría

Diana Rivas Franchini
Jefe del Depto. de Neuropsiquiatría
C.A. 2027-8 - 2027-9



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional
de Ciencias NeurológicasDirección Ejecutiva de Investigación, Docencia y Atención
Especializada en Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Servicio de Neurogenética

ANEXO 4

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



PERÚ

Ministerio
de SaludInstituto Nacional de
Ciencias NeurológicasLABORATORIO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN NEUROGENÉTICA- INCN
RESULTADO DE ANALISIS MOLECULAR PARA ATAXIA FRIEDREICH

Nombres y Apellidos:

Fecha de nacimiento

Sexo:

Status clínico:

Tipo de muestra:

Estado de la muestra:

Código de la muestra:

Método de obtención:

Remitente:

Fecha de obtención:

Fecha de emisión de resultado:

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

RESULTADO MOLECULAR

Presencia de ambos alelos con repeticiones dentro del rango de normalidad.

Presencia de ambos alelos con repeticiones encima del rango de normalidad.

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

Alelo 1: repeticiones GAA.

Alelo 2: repeticiones GAA.

INTERPRETACIÓN

El diagnóstico de Ataxia Friedreich se establece en un paciente mediante la detección de variantes patogénicas bialélicas en gen *FRDA*:**Alelos normales:** de 5 a 33 repeticiones GAA.**Alelos normales mutables:** de > 34- 45 repeticiones GAA.**Alelos con penetrancia completa, patológico:** de 66 A 1800 repeticiones GAA.La precisión de la determinación de número de repeticiones es de ± 1 , los valores obtenidos cerca del límite establecido como patológico deben de ser tratados con especial cuidado.

PROCEDIMIENTO:

El estudio molecular para genotipificación del número de repeticiones en GAA en el intrón 1 del gen *FRDA*, consiste en la amplificación por PCR en tiempo final usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia, determinación del número de repeticiones GAA por electroforesis capilar con marcador de peso molecular, se realizó con *Friedreich's Ataxia GScan™ Kits*.*Esta es una prueba basada en investigación. Se recomendaría una confirmación adicional en una nueva muestra si se traduce para uso clínico.*Centro de Investigación Básica en Neurogenética
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
www.incngen.org.peJr. Ancash N° 1271 Lima, Perú
Teléfono directo: +51 1 411 7779
Correo electrónico: informes@incngen.org.pe

Departamento de Neurología

Diana Rivas Franchini
Jefe del Depto. de Neurogenética
C.A.P. 16328 - PUE - 1500



XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Durr, A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Penet C, Mandel JL, et al (1996) Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *New Engl J Med* 335:1169-1175.
2. Campuzano V, Montermini L, Moltó MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, Monros E, et al (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271:1423-1427.
3. Patel PI and Grazia Isaya G (2001) Friedreich Ataxia: From GAA Triplet Repeat Expansion to Frataxin Deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, 69:15-24.
4. Simon A. B. Knight, S.A.B; Kim, R; Pain, D and Dancis, A. (1999) The Yeast Connection to Friedreich Ataxia. *Am. J. Hum. Genet.*, 64:365-371.
5. Monrós, E. et al. (1997) *Am. J. Hum. Genet.* 61: 101-110.
6. Castro, M. et al. (2000) *Hum. Genet.* 106: 86-92.
7. Pook MA, Al Mahdawi SA, Thomas NH, Appleton R, Norman A, Mountford R, Chamberlain S (2000) Identification of three novel frameshift mutations in patients with Friedreich's ataxia. *J Med Genet* 37:E38.
8. Bradley JL, Blake JC, Chamberlain S, Thomas PK, Cooper JM, Schapira AH (2000) Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 9:275-282.
9. Ohshima K, Montermini L, Wells RD, Pandolfo M (1998) Inhibitory effects of expanded GAA-TTC triplet repeats from intron I of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. *J Biol Chem* 273:14588-14595
10. Bidichandani SI, Ashizawa T, Patel PI (1998) The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am J Hum Genet* 62:111-121.
11. Bradley JL, Blake JC, Chamberlain S, Thomas PK, Cooper JM, Schapira AH (2000) Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 9:275-282.
12. De Michele G, Cavalcanti F, Criscuolo C, Pianese L, Monticelli A, Filla A, Coccozza S (1998) Parental gender, age at birth and expansion length influence GAA repeat intergenerational instability in the X25 gene: pedigree studies and analysis of sperm from patients with Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 7:1901-1906
13. LeProust EM, Pearso CE, Sinden RR, Gao X (2000) Unexpected formation of parallel duplex in GAA and TTC trinucleotide repeats of Friedreich's ataxia. *J Mol Biol* 302:1063-1080.



Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Departamento de Neuropatología
Diana Rivas Franchini
Jefe del Depto. de Neuropatología
C.A. P. 150-5 - JUNIO 1996