

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"



RESOLUCION DIRECTORAL

Lima, 12 ENE. 2017

VISTO:

El expediente N° 16-026230-001-INSN-SB sobre la aprobación de la Guía de Procedimiento de Estudio de Fragilidad Cromosómica de Sangre Periférica; y,

CONSIDERANDO:

Que, los Artículos I y II del Título Preliminar de la Ley N° 26842, Ley General de Salud, establecen que la salud es condición indispensable del desarrollo humano y medio fundamental para alcanzar el bienestar individual y colectivo, por lo que la protección de la salud es de interés público, siendo responsabilidad del Estado regularla, vigilarla y promoverla;

Que, el Segundo párrafo del Artículo 5° del Decreto Supremo N° 013-2006-SA, Reglamento de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo, establece que los establecimientos de salud y servicios médicos de apoyo deben contar, en cada área, unidad o servicio, con manuales de procedimientos, guías de práctica clínica referidos a la atención de los pacientes, personal, suministros, mantenimiento, seguridad, y otros que sean necesarios, según sea el caso;

Que, el inciso s) del Artículo 37° del Decreto Supremo N° 013-2006-SA, Reglamento de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo, establece que al Director Médico le corresponde disponer la elaboración del Reglamento interno, de las guías de práctica clínica y de los manuales de procedimientos referidos a la atención de los pacientes, personal, suministros, mantenimiento, seguridad, y otros que sean necesarios;

Que, mediante Resolución Ministerial N° 302-2015/MINSA fue aprobada la Norma Técnica N° 117-MINSA/DGSP-V.01 "Norma Técnica para la Elaboración y Uso de Guías de Práctica Clínica del Ministerio de Salud", la cual establece el marco normativo para la elaboración de las Guías de Práctica Clínica en el Sector Salud;

Que, el literal a) del numeral II.4.2 del Manual de Operaciones del Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja, aprobado con Resolución Ministerial N° 512-2014/MINSA, establece que es función de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y



Tratamiento, "organizar la prestación de atenciones en los servicios de apoyo al diagnóstico y al tratamiento, según corresponda, en coordinación con la Unidad de Atención Especializada";

Que, mediante el Anexo 3 de la Ficha de Descripción de Procedimiento: "Elaboración, Aprobación y Cumplimiento de Adherencia de las Guías de Práctica Clínica y/o Guía de Procedimiento", del Manual de Procesos y Procedimientos de la Unidad de Gestión de la Calidad, aprobado por Resolución Directoral N° 155/2015/INSN-SB/T se establece la estructura de la Guía de Procedimiento;

Que, mediante la Nota Informativa N° 110-SG-2016/INSN-SB, la Responsable de la especialidad de Genética presenta la "Guía de Procedimiento: Estudio de Fragilidad Cromosómica de Sangre Periférica – puntaje 100 células, estimulada por clastógenos – Fragilidad Cromosómica" solicitando su aprobación con Resolución Directoral; el mismo que cuenta con la opinión favorable de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento, como consta en el Memorando N° 769-2016-USDXT/INSN-SB; y, de la Unidad de Gestión de la Calidad, mediante Nota Informativa N° 00760-2016-UGC-INSN-SB;

Con el visto bueno del Director Adjunto, de la Directora Ejecutiva de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento, de la Jefa de Oficina de la Unidad de Gestión de la Calidad; y, del Jefe de Oficina de la Unidad de Asesoría Jurídica;

Por los fundamentos expuestos y de conformidad con la Ley N° 26842, Ley General de Salud, el Decreto Supremo N° 013-2006-SA, Reglamento de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo, la Resolución Ministerial N° 302-2015/MINSA, la Resolución Ministerial N° 090-2013/MINSA, la Resolución Ministerial N° 512-2014/MINSA; y, la Resolución Jefatural N° 340-2015/IGSS

SE RESUELVE:

ARTÍCULO 1.- Aprobar la Guía de Procedimiento de Estudio de Fragilidad Cromosómica de Sangre Periférica GP-003/USDT-SG/INSN-SB/V1.0 (20 folios), que forma parte de la presente Resolución.

ARTÍCULO 2.- Designar a la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento como la encargada de la implementación de la Guía aprobada con la presente resolución.

ARTÍCULO 3.- Designar a la Unidad de Gestión de la Calidad, como la unidad a cargo de evaluar el cumplimiento de la Guía de Procedimiento de Estudio de Fragilidad Cromosómica de Sangre Periférica.

ARTÍCULO 4.- Disponer la publicación de la presente Resolución en la página Web de la Institución, conforme las normas de Transparencia y Acceso a la Información Pública.

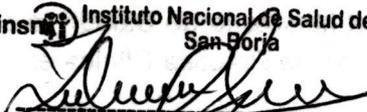
REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y PUBLÍQUESE

EZTG/JCRG/kfb

Distribución

- () Dirección Adjunta
- () Unidad de Atención Integral Especializada
- () Unidad de Gestión de la Calidad
- () Unidad de Asesoría Jurídica
- () Archivo
- () Comunicaciones
- () UTI

INSN Instituto Nacional de Salud del Niño
San Borja


Dra. Zulema Tomás Gonzáles
DIRECTORA GENERAL





PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto de Gestión de Servicios de Salud

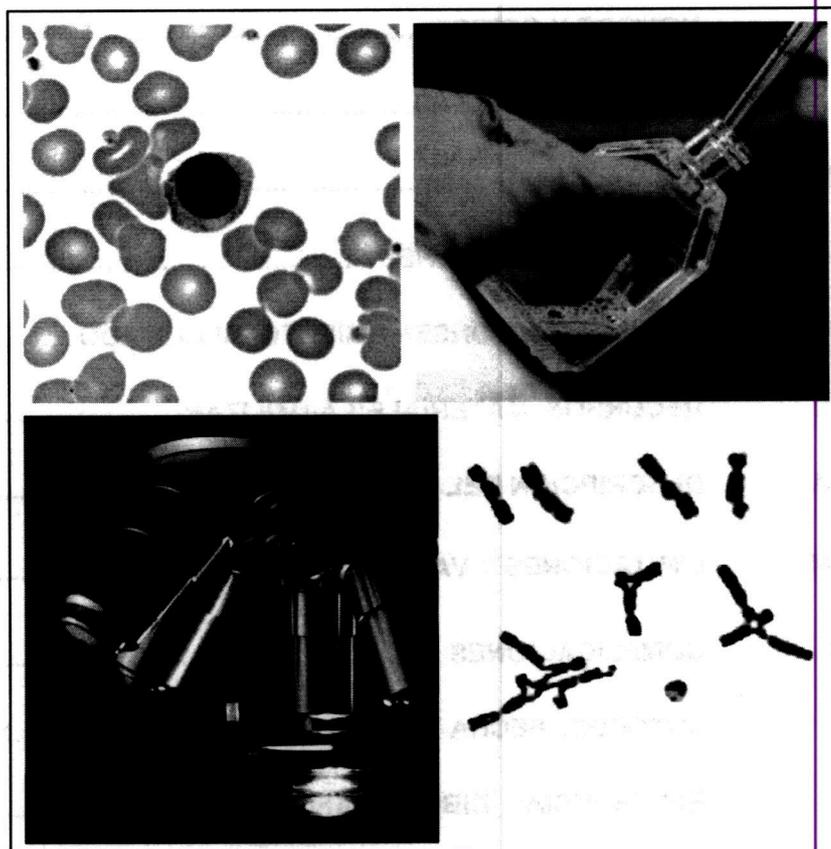
Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



Guía de Procedimiento: Cariotipo en Sangre Periférica - Servicio de Genética
"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE FRAGILIDAD CROMOSÓMICA DE SANGRE PERIFÉRICA

SERVICIO DE GENÉTICA



2016

<p>Elaborado por:</p> <p>Equipo Técnico del Servicio de Genética</p>	<p>Revisado por:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento • Unidad de Gestión de la Calidad 	<p>Aprobado por:</p> <p>Dra. Zulema Tomas Gonzales Directora de Instituto Especializado del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja</p>
---	---	---

Fecha: Diciembre de 2016	Código: GP- 003/USDT-SG/INSN-SB /V1.0	Página 1 de 20
--------------------------	---------------------------------------	----------------





Guía de Procedimiento: Fragilidad Cromosómica en Sangre Periférica

Contenido

I.	NOMBRE Y CÓDIGO	3
II.	DEFINICIÓN	3
III.	INDICACIONES	3
IV.	CONTRAINDICACIONES	4
V.	REQUISITOS: CONSENTIMIENTO INFORMADO	4
VI.	RECURSOS MATERIALES A UTILIZAR	4
VII.	DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	9
VIII.	LIMITACIONES Y VALIDEZ DE LOS RESULTADOS	13
IX.	COMPLICACIONES	14
X.	AUTORES. FECHA Y LUGAR	14
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
XII.	ANEXOS.....	16





I. NOMBRE Y CÓDIGO

Estudio de Fragilidad Cromosómica de Sangre Periférica - puntaje 100 células, estimulada por clastógenos (P. ej. diepoxibutano, mitomicina C, radiación ionizante, radiación UV) - FRAGILIDAD CROMOSOMICA

Código de CPT: **8824901**

II. DEFINICIÓN

El estudio de fragilidad cromosómica es una prueba para la evaluación de la inestabilidad genómica. El síndrome más común diagnosticado mediante esta prueba, es la Anemia de Fanconi (FA). FA se caracteriza por insuficiencia medular a temprana edad, el aumento del riesgo de cáncer y anomalías físicas. Los individuos con FA son clínicamente heterogéneos y hasta un 25% de los pacientes con FA conocido presentan pocas o ninguna de las características.

Esta prueba consiste en cultivar linfocitos que serán expuestos a un agente clastógeno: Diepoxibutano (DEB) y un cultivo de línea de base (control) que no será expuesto al clastógeno. Los individuos afectados presentarán niveles muy altos de aberraciones cromatídicas y cromosómicas, mientras que los individuos no afectados mostrarán poco o ninguna alteración en relación al control.

III. INDICACIONES

Pacientes con: (1)

- Anemia aplásica
- Defectos congénitos característicos de la Anemia de Fanconi, en particular que afecten los radios o pulgares.
- Fenotipo del Síndrome de VACTERL.
- Rupturas cromosómicas espontáneas.
- SMD primario (desde muy joven).
- LMA primario (desde muy joven).
- Sensibilidad inusual a la quimioterapia o radioterapia.
- Cáncer típico de Anemia de Fanconi pero a una edad atípica: como carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello en menores de 50 años

Fecha: Diciembre de 2016

Código: GP- 003/USDT-SG/INSN-SB /V1.0

Página 3 de 20





Guía de Procedimiento: Cariotipo en Sangre Periférica - Servicio de Genética
 "Año de la Consolidación del Mar de Grau"

de edad, cervical en menores de 30 años de edad, anal/vulvar en menores de 40 años de edad.

- Hermano con Anemia de Fanconi.
- Antecedentes familiares consistentes con AF o cáncer (por ejemplo, cáncer de mama).

IV. CONTRAINDICACIONES

Ninguna

V. REQUISITOS: CONSENTIMIENTO INFORMADO

No aplica

VI. RECURSOS MATERIALES A UTILIZAR

6.1 EQUIPAMIENTO DE LA ETAPA DE INICIACION DEL CULTIVO

6.1.1 EQUIPOS BIOMÉDICOS

- Refrigerador de 4°C con Freezer de -20°C.
- Refrigerador de -20°C.
- Baño maría.
- Cabina biológica de seguridad de flujo vertical tipo II.
- Desionizador de agua.

6.1.2 MATERIAL MÉDICO NO FUNGIBLE

- Contador automático (Coulter Counter).
- Gradilla de polipropileno para crioviales de 2ml y 5ml.
- Frasco de cultivo celular de poliestireno graduado 25cm² cuello inclinado con tapa sin filtro (T25).
- Pipetas automáticas.
- Bandejas de metálicas.
- Placas de acero inoxidable.
- Cajas portaláminas.
- Pizarra o clipboard.
- Tijera.
- Pizeta.

Fecha: Diciembre de 2016

Código: GP- 003/USDT-SG/INSN-SB /V1.0

Página 4 de 20





Guía de Procedimiento: Cariotipo en Sangre Periférica - Servicio de Genética
"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

6.1.3 MATERIAL MÉDICO FUNGIBLE

- Pipetas descartables de 3ml.
- Tips estériles para micropipeta.
- Jeringas de 1 ml, 3 ml o 5 ml.
- Papel parafilm.
- Crioviales de 2ml y 5 ml.
- Filtro de aceto de celulosa estéril de 0.2x 25mm de diámetro para jeringa.
- Guantes descartables.
- Gorras quirúrgicas.
- Mascarillas.
- Papel Toalla.
- Recipiente de material punzocortante.
- Masking tape.
- Plumones indelebles.
- Plumones de pizarra.
- Lápiz marcador.
- Lapiceros.
- Cuaderno de registro de las muestras

6.1.4 REACTIVOS

- Medio de Cultivo Pb Max.
- Medio de Cultivo Marrow Max.
- Medio de RPMI.
- Suero bobino fetal (SBF)
- Fitohemaglutinina (PHA)
- L-Glutamina.
- Buffer Hepes.
- Solución de antibiótico – antimicótico para cultivo.
- Diepoxibutano (DEB)
- Etanol.

6.2 EQUIPAMIENTO Y SUPLEMENTOS DE LA ETAPA DE COSECHA

6.2.1 EQUIPOS BIOMÉDICOS

- Cabina biológica de seguridad de flujo vertical tipo II.

Fecha: Diciembre de 2016

Código: GP- 003/USDT-SG/INSN-
SB /V1.0

Página 5 de 20





Guía de Procedimiento: Cariotipo en Sangre Periférica - Servicio de Genética
"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

- Cabina de extracción de vapores
- Balanza analítica electrónica.
- Desionizador de agua.
- Centrífuga.
- Vórtex.

6.2.2 MATERIAL MÉDICO NO FUNGIBLE

Micropipetas 20-100 µl.

Rack para tubos de 15ml.

- Frascos para laboratorio con tapa de 500 y 1000ml.
- Bandeja de metal para tubos de 15 ml.
- Dispensadores para solución hipotónica.
- Dispensador de metanol
- Dispensador de ácido acético glacial
- Cronómetro.
- Tijera.
- Contenedor de bioseguridad de desechos sólidos.
- Pizeta.

6.2.3 MATERIAL MÉDICO FUNGIBLE

- Tips estériles para micropipeta.
- Tubos falcón de 15 ml.
- Pipetas descartables de 3 ml.
- Jeringas descartables de 1ml, 3ml o 5ml.
- Guantes descartables.
- Gorras quirúrgicas.
- Mascarillas.
- Papel Toalla.
- Recipiente de material punzocortante
- Contenedor de bioseguridad para líquidos de desecho.
- Masking tape.
- Plumones indelebles.

6.2.4 REACTIVOS

Fecha: Diciembre de 2016

Código: GP- 003/USDT-SG/INSN-
SB /V1.0

Página 6 de 20





Guía de Procedimiento: Cariotipo en Sangre Periférica - Servicio de Genética
 "Año de la Consolidación del Mar de Grau"

- Solución salina hipotónica KCl.
- Fijador Carnoy.
- Ácido acético glacial.
- Metanol.
- Colcemid: solución de 5 µg/ml.
- Etanol.

6.3 EQUIPAMIENTO DE LA ETAPA DE PREPARACION, COLORACION y ANALISIS DE LAS LÁMINAS

6.3.1 EQUIPOS BIOMÉDICOS

- Cabina biológica de seguridad de flujo vertical tipo II.
- Desionizador de agua
- Balanza analítica electrónica.
- Horno/Incubadora.
- Secadora de cabello.
- Agitador magnético.
- Microscopio Óptico.
- Cámara fotográfica compatible con el microscopio.
- Cariotipador
- Computadora.
- Impresora.

6.3.2 MATERIAL MÉDICO NO FUNGIBLE

- Micropipetas 20-100 µl.
- Copling de vidrio para tinción.
- Gradilla de polipropileno para 24 tubos de 15ml.
- Canastilla de vidrio para coloración de 25 láminas
- Cubeta de metal con asa para coloración de láminas.
- Probetas graduadas de 25, 50 y 100 ml.
- Pinza de acero inoxidable
- Embudo.
- Bageta.
- Frasco para laboratorio con tapa oscuro de vidrio color caramelo de 500 y 1000ml.
- Frascos para laboratorio con tapa de 500 y 1000ml.

Fecha: Diciembre de 2016	Código: GP- 003/USDT-SG/INSN-SB /V1.0	Página 7 de 20
--------------------------	---------------------------------------	----------------





Guía de Procedimiento: Cariotipo en Sangre Periférica - Servicio de Genética
"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

- Frascos de precipitados de 250 ml.
- Portaláminas.
- Pizeta

6.3.3 MATERIAL MÉDICO FUNGIBLE

- Tips estériles para micropipeta.
- Papel aluminio.
- Láminas portaobjeto.
- Pipetas descartables de 3 ml.
- Guantes descartables.
- Mascarillas.
- Papel Toalla.
- Plumones indelebles.
- Papel filtro.
- Masking tape.
- Lápiz marcador.
- Lápiz punta diamante.
- Papel toalla.
- Cuadernos.
- Hojas bond.
- Lapiceros..

6.3.4 REACTIVOS

- PBS.
- Fosfato de Potasio Monobásico.
- Agua Destilada.
- Giemsa.
- Glicerina.
- Carnoy.
- Etanol.
- Metanol.
- Aceite de inmersión.
- Alcohol isopropílico





VII. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

FRAGILIDAD CROMOSÓMICA:

El procedimiento aplica a todo el personal especializado o capacitado en citogenética en enfermedades genéticas hemato-oncológicas.

Comprende las etapas de recepción de la muestra, iniciación del ensayo, cosecha del ensayo de fragilidad cromosómica, preparación, coloración de las láminas y el análisis citogenético.

Se asegurará que los equipos e instrumentos funcionen correctamente, y los reactivos se encuentren estériles y dentro de la fecha de vigencia.

Las normas de bioseguridad se aplicarán durante todo el proceso.

7.1 RECEPCION DE LA MUESTRA REQUISITOS PARA UNA MUESTRA ÓPTIMA:

- Dos tubos con heparina sódica de tapa verde (no usar tubo con heparina de litio, ni EDTA), con un volumen mínimo de 3.0 ml.
- Muestra no debe estar hemolizada, ni contener coágulos.
- Deberán ser transportados inmediatamente a temperatura ambiente.

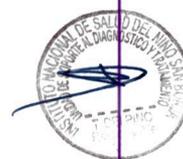
7.1.2 Verificar si la orden de cariotipo de médula ósea registra los siguientes datos: (2)

- Nombres y apellidos del paciente.
- Fecha y Hora de recepción.
- Número de registro.
- Conteo de Leucocitos en sangre periférica.
- Diagnóstico presuntivo.
- Tratamiento recibido: antibióticos, corticoides, quimioterápicos, etc.
- Antecedentes de transfusiones ó trasplantes de médula ósea.
- Nombre del médico tratante/solicitante.

7.2 ETAPA DE INICIACION DEL ENSAYO DE FRAGILIDAD CROMOSOMICA:(3,4)

7.2.1 Preparación de los reactivos: (Ver Anexo N°1)

- Preparación del DEB (Invitrogen): Diluir 1.85 ul DEB en un 2 ml de agua





Guía de Procedimiento: Cariotipo en Sangre Periférica - Servicio de Genética
 "Año de la Consolidación del Mar de Grau"

destilada hasta disolver completamente y guardar en un criovial de 2ml.
 Solución viable hasta 10 días (Rotular con fecha de vencimiento)

- 7.2.2 Antes de iniciar el proceso, encender el UV por 15 minutos en la cabina de extracción
- 7.2.3 Luego encender el ventilador por 5 a 10 minutos
- 7.2.4 El personal deberá colocarse: mandil, gorra quirúrgica, mascarilla y guantes quirúrgicos.
- 7.2.5 Rotular tres frascos T25, el código de la muestra e indicar el tiempo y las características del cultivo, se utilizarán las siguientes abreviaturas

Abreviaturas	Características del cultivo
(72)	72 horas
Control	Cultivo de Control
DEB 1.5 ul	Cultivo con Diepoxibutano 1.5 ul
DEB 2.0 ul	Cultivo con Diepoxibutano 2.0 ul

- 7.2.6 Si el paciente presentará alguna indicación de fragilidad cromosómica
- Retirar del congelador el número apropiado de frascos T25 con Pb Max o preparación de RPMI más suplementos y llevarlos a temperatura ambiente.
 - Se iniciará 3 cultivos con Pb max y/o RPMI más suplementos de 72 horas sin estimular.
 - Realizar conteo celular utilizando el contador automático o utilizando los datos del conteo leucocitario del mismo día de la toma de muestra (incluido en la orden) y anotar el conteo en la hoja de registro del paciente.
 - Agregar el volumen de 1 ml e inocular en 5 ml en cada frasco T25, de acuerdo a la concentración celular óptima indicada
- 7.2.7 Enroscar las tapas y agitar suavemente de manera circular el frasco T25, para dispersar el volumen de muestra.
- 7.2.8 Desenroscar las tapas levemente mediante 1/2 a 1 giro cada una.
- 7.2.9 Colocar los frascos en posición horizontal en la incubadora de CO2 a 37 °C.





Guía de Procedimiento: Cariotipo en Sangre Periférica - Servicio de Genética
 "Año de la Consolidación del Mar de Grau"

7.2.10 A las 24 horas, se tratan de la siguiente manera: 01 cultivo con 1.5 ul de DEB, otro cultivo con 2.5 ul de DEB. El cultivo restante será utilizado como control del daño espontáneo en el paciente.

7.3 ETAPA DE COSECHA

- Preparación del Fijador (Carnoy): mezclando en una proporción de 3 a 1 el metanol y el ácido acético.
- Encender el UV por 15 minutos en la cabina de flujo laminar.
- Luego encender el ventilador por 5 a 10 minutos.
- El personal deberá colocarse: mandil, gorra quirúrgica, mascarilla y guantes quirúrgicos.
- En la cabina biológica de seguridad, agitar de forma circular el frasco de cultivo T25 y hacer la transferencia a un tubo falcón de 15ml, inmediatamente rotular el tubo. Transferir un solo frasco de cultivo a la vez para evitar equivocaciones.
- Sacar el colcemid del refrigerador y dejar a temperatura ambiente.
- Agregar 80µl de colcemid a los frascos de cultivo T25, tapar y mezclar invirtiendo.
- Incubar los tubos falcón de 15ml con las muestras en colcemid a 37 °C por 15 minutos.
- Centrifugar los tubos falcón a 1500 rpm por 10 minutos.
- Aspirar el sobrenadante usando pipetas descartables de 3ml.
- Resuspender el pellet usando la pipeta rotulada y/o golpeando gentilmente el tubo.
- Agregar de 9 ml de solución hipotónica KCl 0.56% pre calentada a 37 °C usando un dispensador o directamente, luego resuspender.
- Incubar los tubos falcón por 30 minutos a 37°C en baño maría.
- Agregar 1.0 ml de fijador Carnoy a cada tubo falcón.
- Cerrar los tubos y mezclar por inversión o agitar con pipeta descartable.
- Centrifugar los tubos a 1800 rpm por 10 min.

Fecha: Diciembre de 2016	Código: GP- 003/USDT-SG/INSN-SB /V1.0	Página 11 de 20
--------------------------	---------------------------------------	-----------------



**Guía de Procedimiento: Cariotipo en Sangre Periférica - Servicio de Genética**

"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

- Aspirar el sobrenadante y resuspender el pellet.
- Agregar 5 a 7ml de fijador Carnoy.
- Resuspender con pipetas respectivas, cerrar y mezclar por inversión.
- Dejar reposar en la gradilla metálica dentro de la cámara de flujo a temperatura ambiente por 10 min.
- Centrifugar los tubos a 1500 rpm por 10 minutos.
- Aspirar sobrenadante y resuspender el pellet.
- Agregar de 5 a 7 ml de fijador Carnoy.
- Mezclar y resuspender con sus respectivas pipetas o por inversión, luego cerrar los tubos falcón.
- Centrifugar los tubos a 1500 rpm por 10 min.
- Repetir pasos 22 al 24 una vez más.
- Aspirar parte del sobrenadante dejando suficiente volumen como para resuspender el número de veces que sean necesarios para la preparación de las láminas.

7.4 PREPARACION DE LÁMINAS

- Homogenizar los tubos falcón que contienen la muestra fijada.
- Depositar de 25ul a 30uL de la muestra fijada en la lámina portaobjeto, deslizando la punta del tip de extremo a extremo para lograr un buen extendido.
- Rotular las láminas con el código del paciente.

7.5 COLORACION CON GIEMSA:**7.5.1 Preparación de los reactivos:**

- Solución colorante Giemsa madre: Disolver 1g de colorante Giemsa en polvo en 84 ml de metanol. Agitar con agitador magnético. Una vez disuelto agregar 54 ml de glicerina y continuar la agitación hasta el día siguiente. Finalmente filtrar.
- Solución colorante Giemsa de trabajo: Mezclar 1 ml de solución Giemsa madre con 9 ml de buffer fosfato salino.

Fecha: Diciembre de 2016

Código: GP- 003/USDT-SG/INSN-
SB /V1.0

Página 12 de 20



**Guía de Procedimiento: Cariotipo en Sangre Periférica - Servicio de Genética**
"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

- 7.5.2 Colorear la lámina con la solución colorante Giemsa de trabajo por 3 a 5 minutos.
- 7.5.3 Secar la lámina con secadora de mano.
- 7.5.4 Evaluar la coloración (condensación de los cromosomas y morfología) y el número de metafases observando la lámina al microscopio a un aumento de 10x, 20x y 100x

7.6 ANALISIS CITOGENÉTICO: (5–9)

- La búsqueda de metafases puede ser manual o automatizada (cariotipador).
- Para el análisis manual se evaluarán las láminas en el microscopio con el objetivo de 10x y se escogerán las metafases completas. Luego se colocará aceite de inmersión y se leerán con el objetivo de 100x.
- Para el análisis de fragilidad cromosómica se analizarán un mínimo de 50 metafases completas hasta un máximo de 100 metafases (análisis óptimo).
- Las aberraciones observadas se deben registrar con las coordenadas de la metafase, de modo que metafases aberrantes puedan ser recuperadas siempre que se considere necesario.
- Se registra el número de eventos por cada aberración cromatídica y cromosómica en cada metafases. A partir de este recuento se calculan varios índices que serán posteriormente utilizados para el análisis citogenético de fragilidad cromosómica. (Ver Anexo N° 2, 3 y 4).
- Se imprimirá: 1 Metafase de una célula multiaberrante. Para detallar las aberraciones, se utilizarán las siglas detalladas en las normas del ISCN 2013.
- Se evaluará la correlación clínica- patológica.

VIII. LIMITACIONES Y VALIDEZ DE LOS RESULTADOS**8.1 LIMITACIONES**

La muestra no es óptima (muestra insuficiente, hemolizada, coagulada, en tubo de heparina con litio o EDTA), insuficiente número de metafases analizables o si no existe correlación clínica-patológica.

Fecha: Diciembre de 2016	Código: GP- 003/USDT-SG/INSN-SB /V1.0	Página 13 de 20
--------------------------	---------------------------------------	-----------------





Guía de Procedimiento: Cariotipo en Sangre Periférica - Servicio de Genética
 "Año de la Consolidación del Mar de Grau"

Los resultados de estudio citogenético tendrán un análisis subóptimo, si los pacientes se encuentran con leucopenia severa, en tratamiento con quimioterápicos.

Los pacientes con transfusiones recientes de sangre (administración menor a 1 mes) tienen el riesgo de microquimerismo, produciendo falsos negativos, por lo que se debe evitar la indicación en este tipo de pacientes. (10-12)

8.2 VALIDEZ DE LOS RESULTADOS:

Validez interna mediante la utilización de un control positivo.

La validez de los resultados se verificará con la correlación clínica-patológica (13).

En el caso de los pacientes transfundidos recientemente con resultados negativos, se le solicitará una nueva muestra (a partir del treintavo día a partir de la administración de la última transfusión). (10-12)

IX. COMPLICACIONES

No aplica

X. AUTORES, FECHA Y LUGAR

- MSc. Oscar Dávila Carlín odavila@insnsb.gob.pe
- Dra. Kelly Franco Bustamante kfranco@insnsb.gob.pe
- Dra. Gioconda Manassero Morales gmanassero@insnsb.gob.pe

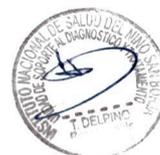
Lugar del Procedimiento: Laboratorio de Citogenética.

Fecha de elaboración: Diciembre del 2016

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- .1 Fanconi Anemia Research Fund, Inc. Anemia de Fanconi: Lineamientos para diagnóstico y manejo. 3a ed. Oregon; 2008. 440 p.
- .2 College of American Pathologist. Cytogenetics Checklist of CAP's Laboratory Accreditation Program. Illinois; 2013. 32 p.

Fecha: Diciembre de 2016	Código: GP- 003/USDT-SG/INSN-SB /V1.0	Página 14 de 20
--------------------------	---------------------------------------	-----------------





Guía de Procedimiento: Cariotipo en Sangre Periférica - Servicio de Genética
"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

- .3 Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi Anemia by Diepoxybutane Analysis: Diagnosis of Fanconi Anemia by Diepoxybutane Analysis. En: Haines JL, Korf BR, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR, editores. Current Protocols in Human Genetics [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2015 [citado el 10 de noviembre de 2015]. p. 8.7.1–8.7.17. Recuperado a partir de: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142905.hg0807s85>
- .4 Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. Lippincott-Raven Publishers; 1997. 706 p.
- .5 Association for Clinical Cytogenetics of UK. General Best Practice. 2007. 25 p.
- .6 Fanconi Anemia Research Fund, Inc. Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. 4a ed. Oregon; 2014. 431 p.
- .7 Oostra AB, Nieuwint AWM, Joenje H, de Winter JP. Diagnosis of Fanconi Anemia: Chromosomal Breakage Analysis. Anemia. 2012;2012:1–9
- .8 Castellà Castellà M, Surrallés i Calonge J, others. Análisis de la variabilidad genética de la anemia de Fanconi en España [Internet]. Universitat Autònoma de Barcelona; 2010 [citado el 10 de noviembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://ddd.uab.cat/record/63185/>
- .9 Nomenclature ISC on HC. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Karger Medical and Scientific Publishers; 2013. 148 p.
- .10 Bloch, EM et al. Transfusion Associated Microchimerism: The Hybrid Within. Transfus Med Rev. 2013; 27(1):10–20.
- .11 Sanchez R. et al. Absence of Transfusion-Associated Microchimerism in Pediatric and Adult Recipients of Leukoreduced and Gamma Irradiated Blood Components. Transfusion. 2012;52(5):936–945.
- .12 Utter GH, Reed WF, Lee TH, Busch MP. Transfusion-associated microchimerism. Vox Sanguinis. 2007;93(3):188-195.
- .13 Escribano G, Castillo S, Daher VN, Salazar SC, Tobella LP, others. Principales factores que producen fragilidad cromosómica transitoria en los pacientes referidos para estudio citogenético. Rev Hosp Clin Univ Chile. 2009;20:20–27.



**XII. ANEXOS****ANEXO N° 01****PRECAUCIONES ESTANDAR PARA EL USO DEL
DIEPOXIBUTANO (DEB)**

El Diepoxibutano o Diepóxido 1,3-butadieno (DEB) es un carcinógeno potencial y se deben de tomar precauciones al manejar este compuesto. (3)

PREPARACIÓN DEL DEB:

- Todo trabajo con DEB debe hacerse usando una Campana de Extracción Química.
- El citogenetista debe llevar una bata de laboratorio, mascarilla, gorra y guantes cuando se trabaja con DEB.
- Una botella de HCl de 6 M (50 ml) debe mantenerse a mano para usar, para inactivar rápidamente DEB en caso de derrames.

CULTIVOS CELULARES:

- Los cultivos celulares que involucren DEB se deben hacer en una Campana de Extracción Química o en Cabina de Seguridad Biológica II.
- Una vez que las células son fijadas, podrán ser tratados fuera de la Cabina de Seguridad.
- Para desechar las soluciones con DEB, se deberá adicionar HCl al 6M y serán considerados como residuos biológicos peligrosos.
- Los frascos de cultivo deberán ser enjuagado con HCl al 6 M, antes de ser desechados.
- Los tips de las micropipetas deben ser colocados en una pequeña botella de HCl al 6 M.
- La solución madre de DEB debe desecharse adicionando HCl al 6M, será considerado como un residuo biológico peligroso.

Fecha: Diciembre de 2016

Código: GP- 003/USDT-SG/INSN-
SB /V1.0

Página 16 de 20





ANEXO N° 03

TERMINOLOGIA DEL ENSAYO INESTABILIDAD CROMOSOMICA

ABERRACIONES CROMATIDICAS (cht):(9)

Son aquellas aberraciones que envuelven a una sola cromátide en un cromosoma.

Se pueden distinguir los siguientes tipos de aberraciones:

- Brecha cromatídica o "chromatid gap" (chtg): es una interrupción en la tinción de una cromátide de 1-2 veces la anchura de que cromátida o mínima desalineación de la cromátide.
- Ruptura de cromátidas o "chromatid break" (chtb): es una interrupción de más de 2 veces el ancho o cuando el fragmento roto está claramente desalineado.
- Intercambios de cromátides (chte): es el resultado de 2 o más lesiones cromatídicas y su subsecuente rearrreglo de material cromatídico. Los intercambios entre cromátides de diferentes cromosomas (intercambios) y entre cromátides de un mismo cromosoma ("intrachanges"). En el caso de los intercambios, pueden adoptar configuraciones triradiales (tr): patrón que involucran 3 brazos, cuatriradiales (qr): patrón que involucran 4 brazos, o complejas (cx): patrón que involucran más de 4 brazos. Eventos cromatídicos: incluyen duplicaciones, deleciones, inversiones paracéntricos

ABERRACIONES CROMOSÓMICAS (chr):(9)

Son aquellas aberraciones que envuelven a ambas cromátides en un cromosoma.

Se pueden distinguir los siguientes tipos de aberraciones:

- Brecha cromosómica o "chromosome gap" (chrg): es una interrupción en la tinción de ambas cromátidas de 1-2 veces la anchura de que cromátida o mínima desalineación de la cromátide.
- Ruptura de cromátidas o "chromatid break" (chrb): es una interrupción de más de 2 veces el ancho o cuando el fragmento roto está claramente desalineado en ambas cromátidas.
- Intercambios cromosómicos (chte): es el resultado de 2 o más lesiones cromosómicas y su subsecuente rearrreglo de ambas cromátides en un cromosoma a nuevas posiciones dentro u otro cromosoma. Estos pueden ser simétricos, por ejemplo: translocación recíproca; o asimétrica, por ejemplo: cromosoma dicéntrico.
- Anillos cromosómicos (r).

ANÁLISIS CITOGENÉTICO:(8)

En el Análisis de fragilidad cromosómica se evalúan las aberraciones cromatídicas y cromosómicas y los puntajes se otorgan como:

- Único evento: a las ruptura cromatídica y cromosómica.

Fecha: Diciembre de 2016	Código: GP- 003/USDT-SG/INSN-SB /V1.0	Página 18 de 20
--------------------------	---------------------------------------	-----------------





Guía de Procedimiento: Cariotipo en Sangre Periférica - Servicio de Genética
"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

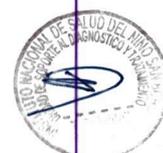
- Dos eventos: a las Configuraciones de intercambio de cromátidas: triradiales y cuatriradiales, dicéntricos, anillos y translocaciones.
- Más de dos eventos: figuras de intercambio complejas y dependiendo del número de centrómeros y rupturas.
- No se considera como eventos a las brechas cromatídicas, cromosómicas y cromosomas pulverizados.

Se utilizará la siguiente terminología:

- Células Aberrantes (CA): Células con un único evento.
- Células Multiaberrantes (CMA): Células con dos o más eventos.
- Numero de eventos de Células Multiaberrantes (NCA): Número total de eventos de células con dos o más eventos.
- Frecuencia de Aberraciones (FA): Número total de eventos de células analizadas, que es igual a la sumatoria de células aberrantes (CA) y número de eventos de células multiaberrantes (NCA).
- Índice de Fragilidad Cromosómica o "Chromosome Fragility Index" (IFC): se calcula de la siguiente manera: $IFC = (\% CA) (FA / CMA)$
- Roturas por célula: se calcula dividiendo la Frecuencia de Aberraciones sobre el número de células analizadas.

Los índices calculados más usados y que se utilizan para el análisis son:

- Índice de Fragilidad Cromosómica o "*Chromosome Fragility Index*" (IFC).
- Roturas por célula o "Breaks per Cells".



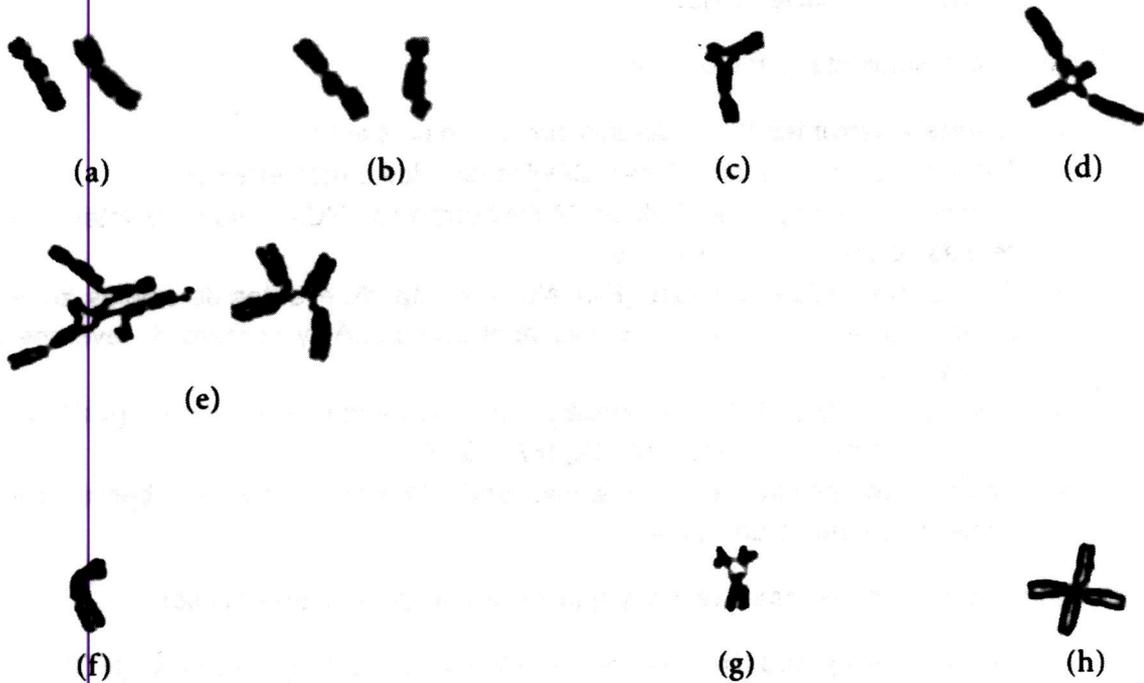
ANEXO N° 04**FIGURA N°1**

Figura N° 1: Ejemplos de aberraciones cromatídicas típicamente observados en un ensayo de fragilidad cromosómica. (a) Brecha Cromatídica; (b) Ruptura de cromátidas; (c) Figura del intercambio de cromátidas triradial; (d) Figura del intercambio de cromátidas cuatriradial; (e) Otras figuras de intercambio de cromátidas.

Ejemplos de imágenes que no deben ser incluidos en el análisis final. (f) Una brecha que no es 100% convincente y debe ser ignorado; (g) Asociación de 3 cromosomas acrocéntricos que muestran "asociación satélite", que no debe confundirse con una triradial y (h) Superposición de cromosomas, que no debe confundirse con un verdadero cuatriradial. (Tomado de Anneke B. Oostra)(7)