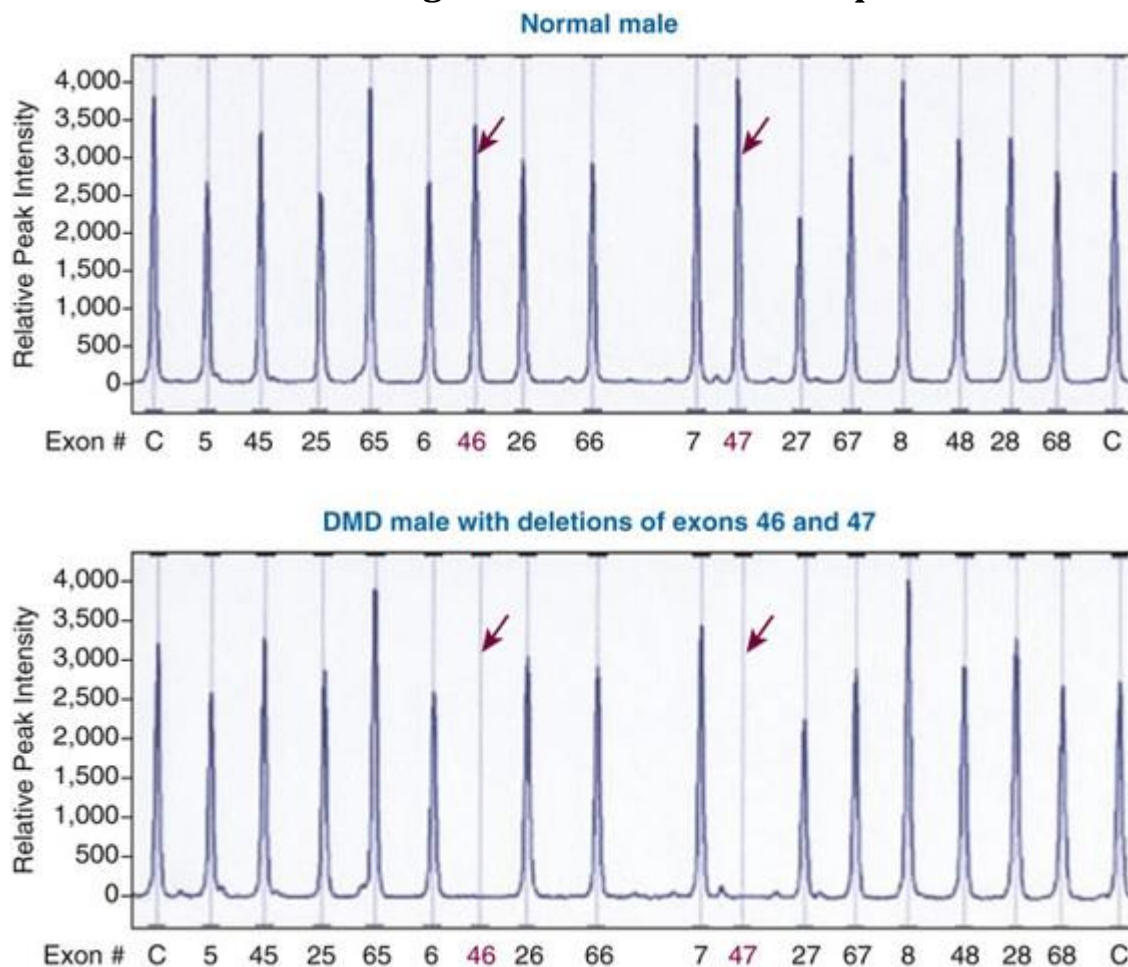


Guía de Procedimiento de análisis de delección y duplicación del gen DMD

Servicio de Patología Clínica

Laboratorio de Biología Molecular e Histocompatibilidad



Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Equipo Técnico del Área de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Servicio de Patología Clínica	<ul style="list-style-type: none"> Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico Unidad de Gestión de la Calidad 	Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director (e) del Instituto Nacional de Salud del - Niño San Borja

Fecha: Abril 2019	Código: GP-017/INSN-SB/USDXT/PC-V 0.1	Página 1 de 11
-------------------	---------------------------------------	----------------

Guía de Procedimiento de análisis de delección y duplicación del gen DMD

I.	Título.....	3
II.	Finalidad	3
III.	Objetivos.....	3
	a. Objetivo General	3
	b. Objetivos específicos.....	3
IV.	Ámbito de aplicación	3
V.	Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT.....	3
VI.	Consideraciones Generales	4
	a. Definiciones Operativas	4
	1. Definición del Procedimiento.....	4
	2. Consentimiento Informado.....	4
	b. Conceptos Básicos	4
	c. Requerimientos Básicos	4
VII.	Consideraciones Específicas	5
	a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento.....	5
	b. Indicaciones.....	10
	1. Indicaciones Absolutas	10
	2. Indicaciones Relativas.....	10
	c. Riesgos o complicaciones frecuentes.....	10
	d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes.....	10
	e. Contraindicaciones.....	10
VIII.	Limitaciones y validez de los resultados.....	10
IX.	Recomendaciones	10
X.	Autores, fecha y lugar.....	11
XI.	Anexos	11
XII.	Bibliografía.....	11

Guía de Procedimiento de análisis de delección y duplicación del gen DMD

I. Título

Guía de procedimiento de análisis de delección y duplicación del gen DMD.

II. Finalidad

El análisis de delección y duplicación del gen DMD (Distrofina) por MLPA (Amplificación multiplex de sondas dependientes de ligamiento), es muy útil porque detecta aproximadamente la causa molecular en el 66% de los casos de sospecha de distrofia muscular de Duchenne. Las distrofias de Duchenne o Becker son enfermedades que afectan principalmente a los músculos esqueléticos y cardíacos. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) normalmente presenta en la temprana infancia retraso y debilidad muscular. DMD tiene una rápida evolución, la mayoría de los enfermos deben usar silla de ruedas hasta la edad de 12 años. Pocos sobreviven más de 30 años, como principales causas de muerte están las complicaciones respiratorias y cardiopáticas. La distrofia muscular de Becker (BMD) se caracteriza por una posterior debilidad muscular, y pueden andar hasta los 20 años. Las mujeres portadoras de la mutación DMD tienen un mayor riesgo de cardiomiopatía y problemas cardiovasculares.

III. Objetivos

a. Objetivo General

Detectar por MLPA delecciones ó duplicaciones en el gen DMD

b. Objetivos específicos

- Detectar por MLPA delecciones en el gen DMD.
- Detectar por MLPA duplicaciones en el gen DMD.
- Corrobar el resultado obtenido de delecciones por PCR multiplex.

IV. Ámbito de aplicación

Pacientes del INSNSB del área de especialidades pediátricas.

V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT

Análisis de delección y duplicación del gen DMD

CPT : 5531

CÓDIGO POE : PC-BMOL

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

La amplificación multiplex de sondas dependientes de ligamiento (MLPA) es una de las técnicas citogenéticas moleculares utilizadas para la detección de variantes de número de copias (CNV) en una región de ADN específica. MLPA fue descrito como una herramienta para la detección de deleciones y duplicaciones de exones en el ser humano. Los primeros genes fueron BRCA1, MSH2 y MLH1 y para la detección de trisomías como Down, Patau o Síndromes de Edward. En los últimos años, varias modificaciones de la técnica original ha sido desarrollada. El principio de MLPA se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con amplificación de sondas ligadas hibridadas a diferentes partes del ADN blanco. MLPA permite que un número relativamente grande de muestras sean procesadas simultáneamente.

2. Consentimiento Informado

No requiere

b. Conceptos Básicos

Las distrofias musculares son un grupo genéticamente heterogéneo de trastornos musculares degenerativos, caracterizados por la progresiva pérdida de fuerza e integridad muscular. La aparición de las distrofias musculares varía de acuerdo a la edad de inicio, severidad, modo de herencia y los grupos musculares afectados. Hay marcada similitud clínica entre pacientes con origen molecular distinto, lo que sugiere que muchos de las proteínas que participan actúan en cascadas. La distrofia muscular de Duchenne / Becker (DMD / BMD) es una trastorno recesivo letal / severo ligado al X que afecta a 1 en 3500 (DMD) y 1 en 30 000 (BMD) nacimientos masculinos. DMD es generalmente diagnosticado entre las edades de 2 y 5 años. Los niños afectados empiezan a movilizarse desde los 18 meses de edad o más tarde y, a menudo, con dificultad, se nota demás mucha dificultad para subir escaleras por la insipiente fortaleza de la musculatura proximal. El confinamiento a una silla de ruedas es inevitable a la edad de 12 años en promedio, debido a atrofia muscular severa y debilidad. La debilidad progresiva de los músculos del diafragma e intercostales eventualmente conduce a insuficiencia respiratoria fatal.

c. Requerimientos Básicos

➤ Equipos Biomédicos

- Analizador Genético ABI 3500
- Termociclador Veriti
- Citómetro de Flujo FacsCalibur
- Magneto de separación celular
- Cabina de Bioseguridad
- Centrífuga refrigerada
- Termobloque
- Vortex
- Micropipetas 1-10 ul
- Micropipeta de 2 – 20 ul

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE ESTUDIO DE DELECIÓN Y DUPLICACIÓN DEL GEN DMD

- Micropipetas 20 – 200 ul
- Micropipeta de 100 – 1000 ul
- Congeladora de - 70°C
- Congeladora de - 20°C
- Refrigeradora de 2 a 8°C
- **Material Médico No Fungible**
 - Tips con filtro de 1 – 10 ul
 - Tips con filtro de 2 – 20 ul
 - Tips con filtro de 20 – 200 ul
 - Tips con filtro de 100 – 1000 ul
 - Criovirales de 2.0 ml
 - Gradillas para tubos de 2.0 ml
 - Gradilla de tubos de 12x75 mm
 - Criobox
 - Contenedor de desechos biológicos de 1L
 - Contenedor de desechos biológicos de 4L
 - Placas de PCR
 - Tapas de microtubos de 0.2ml para PCR en tiempo o Real
- **Material Médico Fungible**
 - **Reactivos**
 - Kit P034-050R. SALSA MLPA P034 DMD mix
 - Kit P035-050R. SALSA MLPA P034 DMD mix
 - EK1-FAM. SALSA MLPA EK1
 - **Materiales**
 - Papel absorbente.
 - Guantes de nitrilo.
 - Gafas protectoras.
 - **Soluciones**
 - Etanol Absoluto
- **Recursos Humanos**
 - Técnico de laboratorio
 - Biólogo
 - Médico Patólogo Clínico

VII. Consideraciones Específicas**a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento**

Tiempo: 40 minutos

a.1. Preparación de la muestra**Al inicio del trabajo:**

- Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
- Antes de iniciar cualquier procedimiento limpiar con alcohol Etilico al 70% o Hipoclorito de sodio al 10%, la superficie de la mesa de trabajo.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE ESTUDIO DE DELECIÓN Y DUPLICACIÓN DEL GEN DMD

- Utilizar contenedores de descarte para objetos punzo cortantes y biocontaminados.

Numeración y centrifugación:

Verificar la calidad de las muestras extraídas, por ejemplo:

- Presencia de coágulos
- Identificación en tubo de colección con EDTA y orden de laboratorio
- Numerar en orden correlativo cada una de las muestras extraídas consignando los siguientes datos:
 - ✓ Tipo de examen solicitado
 - ✓ Fecha de la toma de muestra
- La numeración asignada debe estar indicada en la orden de laboratorio como en el tubo que contiene la muestra. Ejemplo
 - ✓ DMD001/01-11-17DMD001: Código de caso procesado. /01-11-17 Fecha de proceso
- Reposar las muestras extraídas en posición vertical por 20 minutos a temperatura ambiente

Almacenamiento:

- Rotular en orden correlativo los crioviales o tubos necesarios según el cantidad de muestras indicando los siguientes datos:
 - ✓ Nombre del paciente
- Almacenar la sangre total en el correspondiente Criobox según el tipo de prueba en la refrigeradora 2 a 8°C hasta su procesamiento.

Al Final del trabajo:

- Limpiar la superficie de la mesa de trabajo utilizada.
- Dejar los materiales utilizados en su lugar respectivo.
- Eliminar los guantes y otros materiales descartables en los reservorios adecuados (bolsa roja).
- Lavarse las manos con jabón desinfectante disponible.

Preparación de reactivos:

- Añadir 30ml de etanol absoluto al frasco de Buffer de Lavado.

Proceso de Extracción:

- Rotular en orden ascendente el número de crioviales necesarios según la lista de trabajo del día.
- Mezclar por inversión los tubos al vacío que contienen la muestra a evaluar (Aproximadamente por 10 segundos).
- Se procede a la extracción de dos muestras biológicas provenientes de donante y receptor.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE ESTUDIO DE DELECIÓN Y DUPLICACIÓN DEL GEN DMD

- Cargar 200 ul de Sangre total fresca en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 o 2.0 ul.
- Agregar 200 ul de buffer de lisis
- Agregar 30 ul de Proteinasa K
- Mezclar por Vortex (Aproximadamente durante 5 segundos) e incubar a 56 °C por 20 minutos (calor seco), en el caso de folículo piloso incubar 60 minutos.
- Transcurrido el tiempo, adicionar 200 ul de Etanol absoluto y mezclar por Vortex.

Unión a la Columna:

- Cargar el lisado en una columna de extracción (aprox. 640 ul) utilizando una pipeta de transferencia estéril.
- Centrifugar la columna a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un nuevo tubo de colección.

Lavados:

- Agregar 500 ul de Wash Buffer 1
- Centrifugar la columna a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un nuevo tubo de colección
- Agregar 500 ul de Wash Buffer 2
- Centrifugar la columna a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente.
- Descarte el tubo de colección y coloque la columna en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml.

Elución:

- Agregar 60 ul de Buffer de Elución.
- Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Proceder a la Cuantificación del ADN eluido.

Almacenamiento:

- Almacenar a 4 °C si se va a utilizar el DNA extraído en corto tiempo o almacenar a -20°C por periodos más prolongados.

Use una cantidad total de 50-250 ng (50-100 ng es óptimo; esta cantidad debe ser calibrada antes del ensayo)

Fecha: Abril 2019	Código: GP-017/INSN-SB/USDXT/PC-V 0.1	Página 7 de 11
-------------------	---------------------------------------	----------------

MLPA es más sensible a las impurezas que los simples ensayos de PCR monoplex, por lo cual los contaminantes que quedan después de la extracción de ADN pueden influir en el rendimiento de la MLPA. Las preparaciones de ADN deben contener 5-10 mM de tampón Tris con un pH de 8.0-8.5 para evitar la depuración durante la fase inicial.

a.2 Amplificación por PCR en tiempo final (140 minutos)

DENATURACIÓN DE ADN

- Etiquetar tubos, tiras o placas de 0,2 ml.
- Agregue 5 µl de muestra de ADN (50-250 ng; 50-100 ng es óptimo) a cada tubo.
- Utilice TE para un control sin ADN.
- Coloque los tubos en el termociclador; iniciar el programa de termociclador MLPA.
- Desnaturalizar la muestra de ADN durante 5 min. a 98 ° C
- Enfríe las muestras a 25 ° C antes de retirar los tubos del termociclador.

REACCIÓN DE LA HIBRIDACIÓN

- Vortex MLPA buffer y MLPA probemix viales antes de usar.
- Preparar mezcla maestra de hibridación. Para cada reacción, mezcle: 1.5 µl de tampón MLPA (tapa amarilla) + 1.5 µl de probemix (tapa negra). Mezcle bien la mezcla maestra de hibridación pipeteando o agitando en vórtex.
- Después de la desnaturalización del ADN, agregue 3 µl de mezcla maestra de hibridación a cada tubo de muestra. Mezclar bien.
- Continuar con el programa del termociclador: incubar durante 1 minuto a 95 ° C, luego de 16 a 20 horas a 60 ° C

REACCIÓN DE LIGACIÓN

- Agite en vórtex los dos viales de Ligase Buffer antes de usarlos.
- Prepare una mezcla maestra de Ligase-65. Para cada reacción, mezcle: 25 µl de agua ultrapura + 3 µl de Ligase Buffer A (tapa transparente) + 3 µl de Ligase Buffer B (tapa blanca). Caliente el vial de enzimas Ligase-65 durante 10 segundos en su mano para reducir la viscosidad. Luego agregue 1 µl de enzima Ligase-65 (tapa verde). Mezclar bien pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo.
- Continuar con el programa del termociclador: pausa a 54 ° C.
- Cuando el termociclador está a 54 ° C y mientras las muestras están en la placa del termociclador, agregue 32 µl de Ligase-65 mezcla maestra para cada reacción MLPA. Mezclar suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- Continuar con el programa del termociclador: 15 min de incubación a 54 ° C (para ligadura); 5 min a 98 ° C (para la inactivación por calor de Ligasa-

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE ESTUDIO DE DELECIÓN Y DUPLICACIÓN DEL GEN DMD

65 enzima). Pausa a 20 ° C. En este punto, los tubos se pueden extraer del termociclador.

REACCION PCR

- Vortex SALSA PCR Primer vial de mezcla.
- Preparar la mezcla maestra de polimerasa. Para cada reacción, mezcle: 7.5 µl de agua ultrapura + 2 µl de la mezcla de cebador SALSA PCR (tapa marrón).
- Caliente el vial de polimerasa durante 10 segundos en la mano para reducir la viscosidad. Luego agregue 0.5 µl de SALSA Polimerasa (tapa naranja). Mezclar bien pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo. Nunca agite las soluciones enzimáticas.
- A temperatura ambiente, agregue 10 µl de mezcla maestra de polimerasa a cada reacción de MLPA. Mezclar pipeteando suavemente. Coloque directamente los tubos en el termociclador y continúe con el programa del termociclador; 35 ciclos de 30 segundos 95 ° C; 30 segundos 60 ° C; 60 segundos 72 ° C. Se termina con 20 min de incubación a 72 ° C; pausa a 15 ° C.
- Después de la reacción de PCR, no abra los tubos en la habitación con el termociclador. Para evitar la contaminación, utilizar. Diferentes micropipetas para realizar reacciones MLPA y manejar productos de PCR MLPA.
- El producto de PCR se puede almacenar a 4 ° C durante 1 semana. Para períodos más largos, almacenar entre -25 ° C / -15 ° C.
- Como fluorescente los tintes son sensibles a la luz, almacenar los productos de PCR en una caja oscura o envueltos en papel de aluminio.

SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR

- El tamaño estándar, las condiciones de funcionamiento, el polímero, el colorante fluorescente y el volumen de la reacción de PCR MLPA dependen del capilar Tipo de instrumento de electroforesis. Use los ajustes predeterminados en su instrumento de electroforesis capilar. La configuración del instrumento puede requerir optimización para una adecuada separación de fragmentos.
- El uso de capilares viejos o polímeros tiene un efecto perjudicial en los resultados de MLPA. Sustituir capilares y polímero regularmente; Siga las instrucciones del fabricante del instrumento de electroforesis capilar. Polímero rápido se deteriora después de una exposición prolongada a > 25 ° C. En caso de que los picos estándar de tamaño sean repetidamente bajos y amplios, e Los capilares o el polímero pueden estar deteriorados.
- La formamida puede volverse ácida. Esto puede resultar en la depuración y la fragmentación del ADN al calentar. Utilizar alta formamida de calidad y almacénela en alícuotas a -20 ° C.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE ESTUDIO DE DELECIÓN Y DUPLICACIÓN DEL GEN DMD

a.2. Análisis de resultados

- Analizar los resultados en software GneMapper ID-X Software v1.4

a.3. Final del trabajo

1. Limpiar la superficie de la mesa de trabajo utilizada.
2. Dejar los materiales utilizados en su lugar respectivo.
3. Eliminar los guantes y/o otros materiales descartables en los reservorios adecuados (bolsa roja).
4. Lavarse las manos con jabón desinfectante disponible.

b. Indicaciones**1. Indicaciones Absolutas**

Validación de intensidades de fluorescencia para los fragmentos a analizar en pacientes de los distintos servicios de INSN-SB.

2. Indicaciones Relativas

Validación de intensidades de fluorescencia para los fragmentos controles a analizar, de este modo se valida el test.

c. Riesgos o complicaciones frecuentes

Ninguno

d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes

Ninguno

e. Contraindicaciones

Ninguno

VIII. Limitaciones y validez de los resultados

- No cambie el ensayo. Es muy recomendable que un paciente monitorizado permanezca con el mismo tipo de ensayo durante el periodo completo de monitorización.
- No cambie la matriz de la muestra. Es muy recomendable usar la misma matriz de muestra durante el periodo completo de monitorización de cada paciente.
- No válido para cribado de sangre. La carga viral no está pensado para usarse en el cribado de sangre o de productos sanguíneos para identificar la presencia de Hepatitis C Virus.
- Para uso profesional. Este procedimiento es sólo para uso profesional y por personal debidamente formado.

IX. Recomendaciones

No aplica

X. Autores, fecha y lugar

Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja

Laboratorio de Biología Molecular e Histocompatibilidad-Servicio de Patología Clínica.

Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Fecha de Elaboración: Abril 2019

Vigencia: 02 años

Autores:

1. Blgo. Luis Martín Cruz Díaz

lcruz@insnsb.gob.pe

2. Blgo. Madeley Aliaga Zamudio

maliaga@insnsb.gob.pe

3. Dra. Carla Mendez Chacón

cmendez@insnsb.gob.pe

XI. Anexos

No aplica

XII. Bibliografía

1. MLPA® General Protocol Instructions For Use MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) General Protocol for the detection and quantification of DNA sequences.
2. Product Description SALSA® MLPA® Probemix P034-B2 DMD-1 & P035-B1 DMD-2
3. Henriett Pikó. Molecular genetics analyses of the muscular dystrophies in the Hungarian affected families. Semmelweis University Molecular Medicine Ph.D. School.