



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

SUB- UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO

SERVICIO DE GENÉTICA



Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico Equipo Técnico del Servicio de Genética	<ul style="list-style-type: none">Unidad de Soporte al Diagnóstico y TratamientoSub Unidad de Soporte al DiagnósticoUnidad de Gestión de la Calidad	Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director del Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-017/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 1 de 26
------------------	-------------------------------------	----------------



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

I.	Título	3
II.	Finalidad	3
III.	Objetivos	3
	a. Objetivos Generales	3
	b. Objetivos Específicos	3
IV.	Ámbito de aplicación	3
V.	Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT	4
VI.	Consideraciones Generales	4
	a. Definiciones Operativas	4
	1. Definición del Procedimiento	4
	2. Aspectos Epidemiológicos importantes	4
	3. Consentimiento Informado	5
	b. Conceptos Básicos	5
	c. Requerimientos Básicos	6
VII.	Consideraciones Específicas	8
	a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:	8
	b. Indicaciones	13
	1. Indicaciones Absolutas	13
	2. Indicaciones Relativas	14
	c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes:	14
	d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:	14
	e. Contraindicaciones	14
VIII.	Recomendaciones	15
IX.	Autores, Fecha y Lugar	15
X.	Anexos	16
XI.	Bibliografía	17



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS, EN LÍNEA GERMINAL

I. Título

Guía de Procedimiento: Panel Molecular para Síndromes de Cardiopatías Congénitas, en Línea Germinal.

II. Finalidad

Contribuir como un instrumento de apoyo y de mejora continua en los servicios de salud del INSN-SB garantizando la calidad en el desarrollo del Procedimiento: Panel Molecular para Síndromes de Cardiopatías Congénitas, en Línea Germinal.

III. Objetivos

a. Objetivos Generales

- Estandarizar el procedimiento de Panel Molecular para Síndromes de Cardiopatías Congénitas, en Línea Germinal, entre el equipo técnico del Servicio de Genética de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento del Instituto Nacional del Niño de San Borja.

b. Objetivos Específicos

- Contribuir a disminuir la incidencia de complicaciones y errores derivados de la atención de pacientes evaluados mediante el Panel Molecular para Síndromes de Cardiopatías Congénitas, en Línea Germinal

IV. Ámbito de aplicación

La presente Guía de Procedimiento es de aplicación en el Servicio de Genética de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento, en los pacientes de edad pediátrica con diagnóstico de malformación cardiaca aislada, de probable origen genético o cardiopatías congénitas sindrómicas en el Instituto Nacional del Niño de San Borja.

Esta Guía de procedimiento puede ser usada por establecimientos de salud del mismo nivel del Ministerio de Salud, que cuenten con la especialidad.



PERÚ
Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

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

NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS, EN LÍNEA GERMINAL.

CÓDIGO CPT: 81479.05

VI. Consideraciones Generales

Las cardiopatías congénitas son la causa más frecuente de malformaciones congénitas en el recién nacido, y es la primera causa de muerte en la infancia relacionadas a una malformación congénita. Se presentan en 8 a 14 de cada 1000 recién nacidos vivos.

La gran mayoría de cardiopatías congénitas tienen una etiología multifactorial. Se estima que en el 8-10% de los casos la etiología es una anomalía cromosómica, y en el 3-5% se presentan en el contexto de un síndrome monogénico.

El diagnóstico molecular específico de un síndrome genético permite un adecuado asesoramiento y la implementación temprana del seguimiento médico.

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

El procedimiento aplica a todo el personal especializado o capacitado en genética molecular.

La presente guía se aplicará a pacientes de edad pediátrica con sospecha de Síndromes de Cardiopatías Congénitas, en línea germinal del Instituto Nacional del Niño de San Borja.

Comprende las etapas de: toma/recepción de la muestra, extracción de ADN, cuantificación de ADN, preparación de librerías, informe final y validación del informe final.

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.

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-017/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 4 de 26
------------------	-------------------------------------	----------------



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

2. Aspectos Epidemiológicos importantes

Los defectos cardíacos congénitos, son anomalías estructurales del corazón que surgen de anomalías en la formación del corazón o de los principales vasos sanguíneos. Al menos 18 tipos distintos de defectos cardíacos congénitos se reconocen, con muchas variaciones anatómicas adicionales.

Los defectos cardíacos congénitos, tienen una incidencia de 7,5 / 100 nacidos vivos, de incluirse la cardiopatías congénitas acianóticas sin repercusión hemodinámicas, como defectos del tabique auricular o ventricular, se convierte en el defecto de nacimiento más común.

Los defectos cardíacos congénitos considerados moderados o severos, con consecuencias funcionales ocurre en 6-8 de cada 1000 nacidos vivos (19 / 1,000 nacimientos vivos si se incluye la válvula aórtica bicúspide potencialmente grave).

3. Consentimiento Informado

Todo paciente que sea sometido al Procedimiento de Panel Molecular para Síndromes de Cardiopatías Congénitas, en línea germinal debe tener un consentimiento informado.

El consentimiento informado debe ser firmado por el tutor legal del paciente previo a la realización del procedimiento. El médico tratante, debe informar y explicar en términos sencillos en que consiste la patología del paciente, el procedimiento, los objetivos, así como los riesgos y beneficios de este.

El tutor legal debe registrar su aprobación o negación, cumpliendo las normas vigentes, en el formato de Consentimiento Informado (Ver Anexo 1).

Se exceptúa de este procedimiento en caso de pacientes en situación de emergencia, conforme a Ley.

b. Conceptos Básicos

Anomalías conotruncales: Aquellas malformaciones cardíacas que tienen relación con la tabicación del tronco y el cono (vía de salida), proceso que se realiza mientras los grandes vasos van tomando su ubicación definitiva sobre los ventrículos. Dentro de las que se describen: tronco arterioso común, interrupción del arco aórtico, doble salida del ventrículo derecho, tetralogía de Fallot, transposición de grandes vasos.

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-017/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 5 de 26
------------------	-------------------------------------	----------------



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

Genotipo: Conjunto de genes que contiene un organismo heredado de sus progenitores. En organismos diploides, la mitad de los genes se heredan del padre y la otra mitad de la madre.

Fenotipo: Expresión del genotipo en función de un determinado ambiente. Los rasgos fenotípicos cuentan con rasgos tanto físicos como conductuales. Es importante destacar que el fenotipo no puede definirse exclusivamente como la "manifestación visible" del genotipo, pues a veces las características que se estudian no son visibles en el individuo, como es el caso de la presencia de una enzima.

Heterotaxia: El término heterotaxia proviene de las palabras griegas "heteros" (diferente) y "taxis" (ordenamiento). Se trata de la transposición derecha/izquierda de los órganos abdominales y/o torácicos. Abarca diversos trastornos ya que hay múltiples posibilidades de inversiones, que pueden ser completas (situs inversus totalis o situs inversus, es decir, todos los órganos situados normalmente a la derecha están a la izquierda y viceversa), o parciales (situs inversus incompleto, es decir, un número limitado de órganos está invertido, o situs inversus ambiguo, es decir, un órgano normalmente lateral se localiza en el centro).

Retorno anómalo pulmonar total: es una cardiopatía congénita poco frecuente caracterizada por la ausencia de conexión directa entre todas las venas pulmonares y la aurícula izquierda del corazón.

Corazón izquierdo hipoplásico: Síndrome del corazón izquierdo hipoplásico es un padecimiento que ocurre cuando partes del lado izquierdo del corazón (válvula mitral, válvula aórtica, ventrículo izquierdo y aorta) no se desarrollan por completo. La afección es congénita.

Rasopatías: son un grupo de enfermedades de origen genético que se caracterizan por presentar una mutación que afecta a los genes que codifican las proteínas Ras. Las proteínas de la familia Ras desempeñan un importante papel en la proliferación y diferenciación de las células, así como en la supervivencia y muerte celular.

Entre las entidades que se incluyen en este grupo, se encuentran la Neurofibromatosis tipo I, el Síndrome de Noonan, el Síndrome de Legius, Síndrome LEOPARD, el Síndrome de Costello, Síndrome cardiofaciocutáneo y el Síndrome linfoproliferativo autoinmune. La mayoría de estos síndromes comparten una serie de manifestaciones que incluyen la existencia de retraso mental con dificultades de aprendizaje, trastornos del corazón, alteraciones en la forma de la cara - dismorfia facial -, alteraciones de la piel como manchas

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-017/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 6 de 26
------------------	-------------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

de color café con leche y en algunos casos predisposición a la aparición de tumores malignos.

c. Requerimientos Básicos

El procedimiento de Panel Molecular para Síndromes de Cardiopatías Congénitas, en Línea Germinal, se llevará a cabo en el Área de Molecular del Servicio de Genética de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento del Instituto Nacional del Niño de San Borja.

1. Equipos Biomédicos

- Cabina de Bioseguridad.
- Refrigeradora.
- Termociclador.
- Cámara Electroforética.
- Cámara fotográfica.
- Congeladora -20°C.
- Microcentrífuga.
- Vórtex.
- Centrifuga de placa.
- Placa magnética
- Equipo iSeq 100.
- Cuantificador Qubit.



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

2. Materiales Médicos no Fungibles.

- Micropipeta monocal de 0.1–2 µL.
- Micropipeta monocal de 0.5–10 µL.
- Micropipeta monocal de 2–20 µL.
- Micropipeta monocal de 20–200 µL.
- Micropipeta monocal de 100–1000 µL.
- Micropipeta Multicanal de 0.5 – 10 µL.
- Micropipeta Multicanal de 20 – 200 µL.
- Rack para tubos de 0.2 mL.
- Rack para tubos de 1.5 - 2.0 mL.

3. Materiales Médicos Fungibles

- Guantes de Nitrilo.
- Tubos de 0.2 mL.
- Tubos de 0.5 mL.
- Tubos de 1.5 – 2.0 mL.
- Tips de 10, 20, 200 y 1000 µL.
- Placas de 96 pozos para iSeq 100.
- Cubiertas de plástico para placas de 96 pozos

4. Reactivos de Laboratorio:

- Kit de reactivos del iSeq 100 para el panel de cardiopatías.
- Kit de extracción de ADN.
- Kit de cuantificación de ADN.
- Agarosa.
- Buffer TAE 1X.
- Marcador de peso molecular de 50 bp.
- Colorante para determinación de peso molecular de ADN.
- Etanol de grado molecular.

VII. Consideraciones Específicas

a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:

1. Recepción de la Muestra:

- Recepción de la muestra y orden médica correspondiente.

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-017/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 8 de 26
------------------	-------------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

- Verificar la información y evaluar la muestra.
- Colocar el código de laboratorio que le corresponde al tubo de muestra y a la orden médica.

○ *Función del Técnico de Laboratorio*

2. Lisis de glóbulos rojos y concentración de glóbulos blancos (tratamiento previo):

- Rotular un tubo de 1.5 mL con el código de la muestra.
- Añadir 500 µL de la sangre al tubo lila.
- Colocar 1 mL de agua de PCR helada y mezclar por vórtex o pipeteo.
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Centrifugar a 800 g (~ 3000 RPM) por 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Resuspender en 200 µL de PBS 1X.
- Proceder al protocolo de extracción.

3. Extracción del ADN

- Según guía de procedimiento de extracción de ADN en sangre periférica.

4. Viabilidad del ADN:

- Las muestras cuantificadas deben ser evaluadas para ver su viabilidad del ADN.
- Preparar un gel de agarosa al 1%.
- Cargar 3 µL de ADN más 2 µL de Safe-green en los pozos del gel.
- Adicionar el marcador de peso molecular.
- Iniciar la corrida de electroforesis a 90 voltios por 30 minutos aproximadamente.
- Visualizar el gel en el transiluminador de la luz UV. Tomar una foto para ver la viabilidad del ADN (ver figura 1).



Figura 1. Se observa que las muestras de ADN están viables para el NGS.

5. Cuantificación de ADN:

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-017/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 9 de 26
------------------	-------------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

- La cuantificación del ADN de las muestras se realizará mediante la utilización del kit ***QUBIT High-Sensitivity***.
- Preparar la solución de trabajo en un tubo de 15 mL, el volumen necesario de buffer es $199 \mu\text{L} \times (2+N)$ y el volumen necesario del fluoróforo es $1 \mu\text{L} \times (2+N)$; donde “N” es el número de muestras.
- Homogenizar y añadir $190 \mu\text{L}$ de solución de trabajo a 2 tubos de 0.5 mL y adicionar $10 \mu\text{L}$ de estándar a cada tubo.
- De igual forma añadir $199 \mu\text{L}$ de solución de trabajo a N tubos de 0.5 mL y adicionar $1 \mu\text{L}$ de ADN.
- Homogenizar suavemente e incubar en oscuridad por 2 min.
- Llevar los tubos al cuantificador Qubit y seleccionar la función respectiva del ensayo (dsDNA).
- Colocar los tubos estándar y luego los tubos de muestra.
- Seleccionar la función para determinar la concentración.
- Seleccionar $1 \mu\text{L}$ como volumen de inicio.
- Anotar el valor de la concentración del ADN purificado de la muestra.
- La concentración se expresa en $\text{ng}/\mu\text{L}$.
- De ser necesario se lleva la concentración del ADN a $4 \text{ ng}/\mu\text{L}$.
- *Función del Biólogo.*

6. Amplificación del ADN:

- Agregar $5 \mu\text{L}$ del 5X Ampliseq HiFi Mix a un tubo de PCR.
- Seguidamente adicionar $7.5 \mu\text{L}$ de la muestra de ADN ($4 \text{ ng}/\mu\text{L}$)
- El volumen resultante de $12.5 \mu\text{L}$ se dispensa en dos pozos (pozo 1 y pozo 2), $5 \mu\text{L} \times \text{pozo}$ en la placa de PCR.
- Adicionar $5 \mu\text{L}$ de los primers 2X Ampliseq DNA Panel Pool 1 al pozo 1.
- Adicionar $5 \mu\text{L}$ de los primers 2X Ampliseq DNA Panel Pool 2 al pozo 2.
- Homogenizar por pipeteo.
- Sellar la placa de PCR y colocarlo en el termociclador.
- Elegir la opción “tapa pre-calentada” a 105°C antes de iniciar la corrida de PCR.
- Seleccionar el programa de PCR en el termociclador:
AMP_DNA que tiene las siguientes especificaciones:
 - 99°C por 2 minutos.
 - 15 ciclos de:
 - 99°C por 15 segundos.
 - 60°C por 8 minutos.
 - Mantener a 10°C hasta por 24 horas.

7. Digestión parcial de los amplicones:

- Combinar los $10 \mu\text{L}$ del producto de PCR del pozo 2 a las muestras contenidas en el pozo 1, resultando un volumen total de $22 \mu\text{L}$.
- Adicionar $2 \mu\text{L}$ del reactivo FuPa.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

- Homogenizar por pipeteo.
- Sellar la placa de PCR y colocarlo en el termociclador.
- Elegir la opción “tapa pre-calentada” a 105 °C antes de iniciar el programa.
- Seleccionar la siguiente corrida en el termociclador:
FUPA_PROGRAM que tiene las siguientes especificaciones:
 - 50 °C por 10 minutos.
 - 55 °C por 10 minutos.
 - 62 °C por 20 minutos.
 - Mantener a 10 °C hasta por 1 hora.

8. Ligación de índices:

- Agregar a la placa que contiene los 22 µL del producto de la digestión los siguientes reactivos respetando el orden.
- 4 µL del reactivo Switch Solution.
- 2 µL del reactivo AmpliSeq CD Indexes.
- 2 µL del reactivo DNA Ligase.
- Homogenizar por pipeteo el volumen total obtenido de 30 µL.
- Sellar la placa y colocarlo en el termociclador.
- Elegir la opción “tapa pre-calentada” a 105 °C antes de iniciar el programa.
- Seleccionar la siguiente corrida en el termociclador:
LIGATE_PROGRAM que tiene las siguientes especificaciones:
 - 22 °C por 30 minutos.
 - 68 °C por 5 minutos.
 - 72 °C por 5 minutos.
 - Mantener a 10 °C hasta por 24 horas.

9. Limpieza de la librería:

- Adicionar 30 µL de Agencourt AMPure XP beads a cada librería.
- Homogenizar por pipeteo.
- Sellar la placa de la librería y verificar que la mezcla sea homogénea.
- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Colocar la placa en el soporte magnético.
- Incubar a temperatura ambiente hasta que sobrenadante sea transparente (aprox. 2 minutos).
- Remueva el sobrenadante de cada pozo y evite llevarse las perlas.
- Adicionar 150 µL de etanol al 70% fresco que se haya preparado al momento.
- Incubar a temperatura ambiente por 30 segundos.
- Descartar el sobrenadante sin llevarse las perlas.
- Repetir el lavado anterior con etanol al 70% fresco por segunda vez.
- Dejar secar las perlas magnéticas a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos.
- Asegurarse que todo el etanol se haya descartado para evitar inhibición del PCR.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

10. Amplificación de la librería:

- Adicionar 45 µL del reactivo 1X Lib Amp Mix.
- Adicionar 5 µL del reactivo 10X Library Amp Primers.
- Homogenizar por pipeteo.
- Sellar la placa de la librería y colocarlo en el termociclador.
- Elegir la opción “tapa pre-calentada” a 105 °C antes de iniciar el programa.
- Seleccionar el programa de PCR en el termociclador:
AMP_LIBRARY que tiene las siguientes especificaciones:
 - 98°C por 2 minutos.
 - 7 ciclos de:
 - 98°C por 15 segundos.
 - 64°C por 1 minuto.
 - Mantener a 10 °C hasta por 24 horas.

11. Segunda limpieza de la librería:

- Adicionar 25 µL de Agencourt AMPure XP beads.
- Mezclar bien la solución con la micropipeta.
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Colocar la placa en el soporte magnético.
- Incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir a una nueva placa todo el sobrenadante (aprox. 75 µL), el cual contiene la librería de amplicones deseada.
- Adicionar 60 µL de Agencourt AMPure XP beads.
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Colocar la placa en el soporte magnético.
- Incubar 2 minutos a temperatura ambiente hasta que el sobrenadante sea transparente.
- Descartar el sobrenadante sin llevarse las perlas.
- Adicionar 150 µL de etanol al 70% fresco que se haya preparado al momento.
- Incubar por 30 segundos.
- Descartar el sobrenadante sin llevarse las perlas.
- Repetir el lavado anterior con etanol al 70% fresco por segunda vez.
- Dejar secar las perlas magnéticas a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos.
- Asegurarse que todo el etanol se haya descartado para evitar inhibición del PCR.
- Retirar la placa del soporte magnético.
- Adicionar 30 µL del reactivo Low TE y cubrir la placa.
- Homogenizar por pipeteo.
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Colocar la placa en el soporte magnético.
- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

- Transferir 27 μ L del sobrenadante a una nueva placa (placa LoBin PCR), evite llevarse las perlas magnéticas ya que en la solución se encuentra la librería de amplicones.

12. Verificación de la librería:

- La verificación se realiza cuantificando el producto final de acuerdo al paso 5.
- Se debe llevar el producto a una concentración final de 2 nM y un volumen final de 10 μ L.
- Se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Molaridad (nM)} = \frac{A \text{ ng/ } \mu\text{L} \times 10^6}{660 \text{ g/mol} \times N}$$

Dónde: A = Concentración de librería en ng/ μ L (Se obtiene del Qubit)

N = Tamaño promedio del fragmento (350 bp)

- Adicionalmente se hace una corrida en un gel de 1% para observar que los productos tengan un peso aproximado de 350 bp.

13. Corrida del producto normalizado en el iSEQ100:

- Todos los productos normalizados de todas las muestras se junta en un solo pool, y se lleva a la concentración de 2 nM.
- Pasar de 2 nM a 50 pM, mezclando 2.5 μ L de pool anterior con 97.5 μ L de buffer Low TE.
- Llevar el PhiX de 10nM a 50 pM en un 100 μ L.
- Retirar 1 μ L de pool (50pM) y agregar 1 μ L del PhiX (50pM).
- Colocar 20 μ L en el cartucho del iSeq 100 del volumen final resultante en el paso anterior (100 μ L).
- Colocar el cartucho en el iSeq 100 y empezar la corrida de secuenciamiento.
- La corrida dura aproximadamente 17 horas.
- Cuando haya concluido la corrida se saca los archivos del iSeq 100 para que sean analizados.
 - Función del Biólogo.*

14. Análisis del Resultado:

- El análisis se realiza mediante el software Local Run Manager y los resultados se obtienen y se guardan en el BaseSpace.
 - Función del Biólogo y del médico Genetista.*

b. Indicaciones

1. Indicaciones Absolutas

Ver anexo 2.

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-017/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 13 de 26
------------------	-------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

Pacientes con las siguientes cardiopatías aisladas.

- Dextrocardia.
- Tetralogía de Fallot – Ebstein.
- Trasposición de grandes vasos.
- Retorno anómalo pulmonar total.
- Malformaciones conotruncales.
- Cardiopatía congénita múltiple, tipo 4.
- Cardiopatía congénita múltiple, tipo 2.
- Corazón izquierdo hipoplásico, sin valvulopatía.

Pacientes con cardiopatías congénitas estructurales sindrómicas de los siguientes síndromes:

- Rasopatías: Síndrome Noonan, síndrome cardiofaciocutáneo, síndrome Leopard, Síndrome Legius, Neurofibromatosis 1.
- Síndrome Marfan.
- Homocisteinuria clásica.
- Síndrome Alagille.
- Asociación VACTERL.
- Síndrome Kabuki.
- Síndrome CHARGE: Después de cariotipo.
- Síndrome Holt –oram.
- Ehler Danlos tipo vascular.
- Síndrome de tortuosidad arterial.
- Síndrome de Cornelia de Lange: después de cariotipo.
- Síndrome Loeys –dietz.
- Síndrome Ellis Van Creveld.
- Síndrome Rubinstein- Taybi.

2. Indicaciones Relativas

Espectro incompleto de los síndromes mencionados en indicaciones absolutas (ver anexo 2).

c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes:

Las relacionadas a la toma de muestra de sangre periférica. Se solicitará una nueva muestra, si la muestra no es óptima (sospecha de contaminación, tubo inapropiado, etc.)

d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:

Ninguna

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-017/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 14 de 26
------------------	-------------------------------------	-----------------



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

e. **Contraindicaciones**

Ninguna

VIII. Recomendaciones

Es necesario cumplir con las indicaciones de la guía de procedimientos siguiendo protocolos de buenas prácticas de Laboratorio.

Los informes finales deberán contar con una hoja de registro para estudio del panel molecular para síndromes de cardiopatías congénitas, en línea germinal, y una tabla de resultados producto del análisis realizado por personal especializado en biología molecular.

Describir las eventualidades al realizar la prueba, en el cuadro de observaciones.

IX. Autores, Fecha y Lugar

Nombre del Ejecutor responsable: Dra. Gioconda Manassero Morales

Fecha, hora y Lugar del procedimiento: Servicio de Genética - Laboratorio de Molecular

Fecha de elaboración y vigencia del Procedimiento: Abril 2019, con vigencia de 2 (dos) años.

Lista de Autores y correos electrónicos

Dra. Gioconda Manassero Morales

g.manassero@insnsb.gob.pe

Dra. Kelly Franco Bustamante

kfranco@insnsb.gob.pe

Dr. Luis Celis García

lcelis@insnsb.gob.pe

Dr. Nathaly Caballero Bedón

ncaballero@insnsb.gob.pe

Blgo. Carlos Figueroa Villanueva

cafigueroa@insnsb.gob.pe

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-017/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 15 de 26
------------------	-------------------------------------	-----------------



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

X. Anexos

ANEXO N°1

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS, EN LÍNEA GERMINAL

(DS.N°027-2015-SA. Reglamento de la Ley N°29414. Ley que establece los Derechos de las Personas Usuarias de los Servicios de Salud. Ley General de Salud N° 26842. RD N°/2019/INSNSB)

Nombre del Procedimiento: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS, EN LÍNEA GERMINAL.

Servicio: Genética

Se realizará la siguiente prueba por la sospecha de síndromes de Cardiopatías Congénitas, en línea germinal.

Descripción del Procedimiento

Se tomará muestra de 3 mL de sangre periférica, como se realiza en otras pruebas de rutina. A partir de esa muestra de sangre, se extraerá el ácido desoxirribonucleico (ADN), del que se analizarán los genes relacionados con cardiopatías congénitas probablemente sindrómicas o con cardiopatías congénitas estructurales aisladas de probable origen genético.

Objetivos del Procedimiento

Evaluar variantes en genes relacionados con cardiopatías congénitas probablemente sindrómicas o con cardiopatías congénitas estructurales aisladas de probable origen genético.

Beneficios Esperados

Precisar el diagnóstico de sospecha, y así mejorar la intervención en los posibles problemas relacionados.

Riesgos ó Complicaciones Frecuentes

Las relacionadas a la toma de muestra de sangre periférica. Se solicitará una nueva muestra, si la muestra no es óptima (sospecha de contaminación, tubo inapropiado, etc.)

Riesgos ó Complicaciones poco Frecuentes

No se reporta.

Consecuencias previsibles de la NO realización del procedimiento

Al no definirse el diagnóstico, la intervención precoz de los posibles problemas asociados, a la condición genética, no se realizarían en forma óptima.

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-017/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 16 de 26
------------------	-------------------------------------	-----------------



PERÚ
Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

Describir posibilidad de Tratamiento Alternativo

No se ha descrito tratamiento alternativo, salvo medidas de soporte.

Riesgos en Función de las Particularidades del Paciente:

Se describen los relacionados a la toma de muestra de sangre periférica.

Pronóstico: Bueno () Malo () Reservado ()

Recomendaciones/Observaciones:

El asesoramiento posttest debe ser realizado en todo momento por un Médico Genetista en consultorio externo y/o durante la hospitalización.

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo _____, identificado (a) con DNI (), C.E. (), Pasaporte () N° _____, en calidad de Madre (), Padre (), Apoderado/Tutor Legal () del (la) paciente _____, con _____ de edad, identificado con DNI N° _____, Historia Clínica N° _____, con el Diagnóstico: _____

Declaro:

Que el Médico _____ con CMP N° _____, y RNE N° _____, me ha explicado que es conveniente/necesario, debido al diagnóstico de mi familiar, la realización del procedimiento de **PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS, EN LÍNEA GERMINAL** sobre el cual he sido informado. Así mismo he comprendido los beneficios, probables riesgos o complicaciones del mismo.

Por lo tanto con la información completa, oportuna y sin presión; yo, voluntaria y libremente:

Doy mi Consentimiento para el Procedimiento: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS, EN LÍNEA GERMINAL.



Huella Digital

San Borja,..... de.....del 20.....

Firma del Representante Legal

Nombre _____

DNI N° _____

Firma del Médico

CMP N° _____

RNE N° _____

Fecha: Mayo 2019

Código: GP-017/USDT-SG/INSN-SB/V1.0

Página 17 de 26



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Yo _____, identificado (a) con DNI (), C.E. (), Pasaporte () N° _____, en calidad de Madre (), Padre (), Apoderado/Tutor Legal () del (la) paciente _____, con _____ de edad, identificado con DNI N° _____, Historia Clínica N° _____, de forma libre y consciente he decidido **Revocar el Consentimiento** firmado en fecha _____ para la realización del Procedimiento de **PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS** _____ y asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida de mi representado.



San Borja, dedel 20.....

Firma del Representante Legal

Nombre _____
DNI N° _____

Huella Digital

Firma del Médico

CMP N° _____
RNE N° _____

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

ANEXO N°2

Genes asociados a cardiopatías no sindrómicas

DEXTROCARDIA	
<i>ACVR2B</i>	<i>DNAI2</i>
<i>CCDC39</i>	<i>DNAL1</i>
<i>CCDC40</i>	<i>FOXH1</i>
<i>CFC1</i>	<i>GDF1</i>
<i>CHD7</i>	<i>INVS</i>
<i>CRELD1</i>	<i>LEFTY2</i>
<i>DNAAF1</i>	<i>NME8</i>
<i>DNAAF2</i>	<i>NODAL</i>
<i>DNAAF3</i>	<i>ZIC3</i>
<i>DNAH11</i>	<i>CFAP53</i>
<i>DNAH5</i>	<i>MMP21</i>
<i>DNAI1</i>	<i>PKD1L1</i>

TETRALOGIA DE FALLOT - EIBSTEIN	
<i>GATA4</i>	<i>GDF1</i>
<i>ZFPM2</i>	<i>JAG1</i>
<i>GATA6</i>	<i>TBX1</i>
<i>NKX2-5</i>	

TRANSPOSICIÓN DE GRANDES VASOS
<i>MED13L</i>

RETORNO ANÓMALO PULMONAR TOTAL
<i>ANKRD1</i>

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

ANOMALÍA CONOTRUNCAL	
<i>NKX2-5</i>	<i>TBX1</i>
<i>GATA6</i>	<i>NKX2-6</i>

DEFECTOS CONGÉNITOS CARDIACOS MÚLTIPLES TIPO 4
<i>NR2F2</i>

DEFECTOS CONGÉNITOS CARDIACOS MÚLTIPLES TIPO 2
<i>TAB2</i>

CORAZÓN IZQUIERDO HIPOPLÁSICO	
<i>NKX2-5</i>	<i>GJA1</i>

Genes asociados a cardiopatías sindrómicas

RASOPATÍAS	
<i>BRAF</i>	<i>PTPN11</i>
<i>CBL</i>	<i>RAF1</i>
<i>HRAS</i>	<i>RIT1</i>
<i>KRAS</i>	<i>SHOC2</i>
<i>MAP2K1</i>	<i>SOS1</i>
<i>MAP2K2</i>	<i>NF1</i>
<i>NRAS</i>	<i>SPRED1</i>
<i>NS2</i>	

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

SINDROME DE CORNELIA DE LANGE	
<i>NIPBL</i>	<i>SMC1A</i>
<i>RAD21</i>	<i>HDAC8</i>
<i>SMC3</i>	

SINDROME DE MARFAN	
<i>FBN1</i>	<i>TGFBR2</i>

SINDROME DE TORTUOSIDAD ARTERIAL
<i>SLC2A10</i>

SINDROME DE ALAGILLE	
<i>NOTCH2</i>	<i>JAG1</i>

SINDROME DE HOLT ORAM
<i>TBX5</i>

HOMOCISTINURIA CLÁSICA
<i>CBS</i>

ESTENOSIS AÓRTICA SUPRAVALVULAR
<i>ELN</i>

VACTERLX
<i>ZIC3</i>

**GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN
LÍNEA GERMINAL**

SINDROME DE KABUKI	
<i>KMT2D</i>	<i>KDM6A</i>

SINDROME DE CHARGE	
<i>CDH7</i>	

SINDROME DE EHRLES DANLOS TIPO IV	
<i>COL3A1</i>	

SINDROME DE LOEYS-DIETZ	
<i>TGFB2</i>	<i>TGFB3</i>
<i>TGFBR2</i>	<i>SMAD3</i>
<i>TGFBR1</i>	

SINDROME DE ELLIS-VAN CREVELD	
<i>EVC2</i>	<i>EVC</i>

SINDROME DE RUBINSTEIN-TAYBI	
<i>CREBBP</i>	<i>EP300</i>

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL**ANEXO N°3**

Preparación de Librerías (Grupo de Amplicones de los Genes) para el proceso del Análisis por Secuenciamiento en el equipo iSeq de Illumina®



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

ANEXO N°4

Algoritmo de Procesamiento de Datos Genómicos del Secuenciamiento de Masivo Paralelo hasta la interpretación de las variantes genéticas

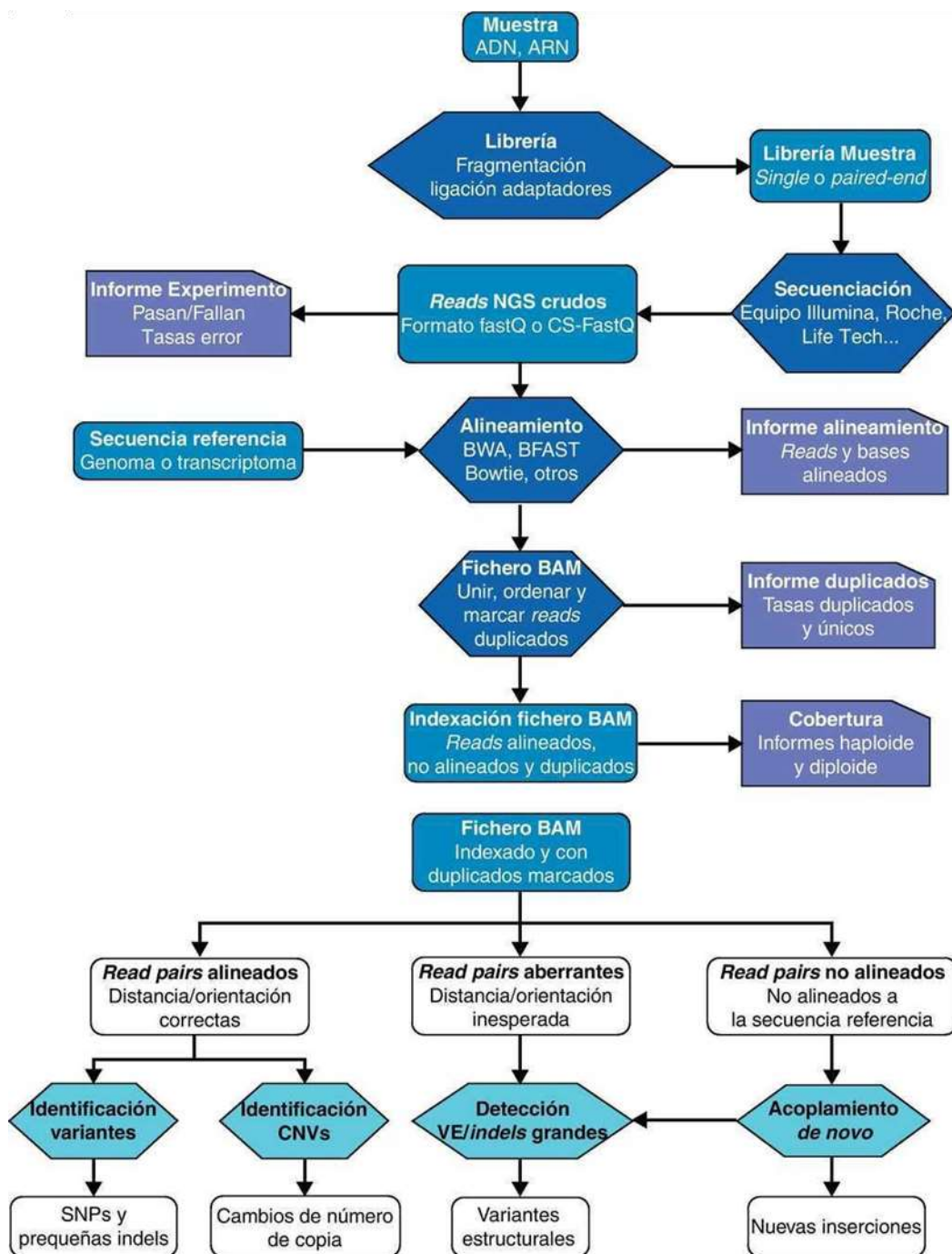


Imagen extraída de la publicación de: Rodríguez-Santiago B y Armengol L. (25)



PERÚ
Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

XI. Bibliografía

- [1] Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. J Am Coll Cardiol 2002; 39(12): 1890-900.
- [2] Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. Nature 2008; 451(7181): 943-8.
- [3] Ferencz C, Rubin JD, Loffredo CA, Magee CM. The epidemiology of congenital heart disease, The Baltimore-Washington Infant Study (1981-1989). Perspectives in Pediatric Cardiology, Mount Kisco, NY: Futura Publishing Co.Inc, 1993; vol. 4.
- [4] Bernstein D. Evaluation of the cardiovascular system. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, Eds. Nelson Textbook of Pediatrics 17th ed. Philadelphia, Saunders 2004; pp 1481-8
- [5] Pierpont ME, Basson CT, Benson DW, Jr., et al. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. Circulation 2007; 115(23): 3015-38.
- [6] Scambler PJ. The 22q11 deletion syndromes. Hum Mol Genet 2000; 9(16): 2421-6.
- [7] Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, et al. Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. J Am Coll Cardiol 1998; 32(2): 492-8.
- [8] Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, et al. Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. Nat Genet 1993; 5(1): 11-6.
- [9] Ewart AK, Jin W, Atkinson D, Morris CA, Keating MT. Supravalvular aortic stenosis associated with a deletion disrupting the elastin gene. J Clin Invest 1994; 93(3): 1071-7.
- [10] Li DY, Toland AE, Boak BB, et al. Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supravalvular aortic stenosis. Hum Mol Genet 1997; 6(7): 1021-8.
- [11] Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. Nature 1991; 352(6333): 337-9.
- [12] Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, et al. Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. Nat Genet 1997; 15(1): 30-5.
- [13] Li L, Krantz ID, Deng Y, et al. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. Nat Genet 1997; 16(3): 243-51.
- [14] Oda T, Elkahoul AG, Pike BL, et al. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. Nat Genet 1997; 16(3): 235-42.
- [15] McDaniell, R, Warthen DM, Sanchez-Lara, PA, et al. NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. Am J Hum Genet 2006; 79(1): 169-73.
- [16] Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. Nat Genet 2001; 29(4): 465-8.
- [17] Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. Nat Genet 2007; 39(1): 75-9.
- [18] Roberts AE, Araki T, Swanson KD, et al. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. Nat Genet 2007; 39(1): 70-4.
- [19] Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, et al. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. Nat Genet 2007; 39(8): 1013-7.
- [20] Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. Nat Genet 2007; 39(8): 1007-12.

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-017/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 25 de 26
------------------	-------------------------------------	-----------------



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROMES DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN LÍNEA GERMINAL

- [21] Kratz, CP, Zampino G, Kriek, M, et al. Craniosynostosis in patients with Noonan syndrome caused by germline KRAS mutations. *Am J Med Genet A* 2009; 149A(5): 1036-40.
- [22] Digilio, MC, Conti E, Sarkozy, A, et al. Grouping of multiple lentigines/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene. *Am J Hum Genet* 2002; 71(2): 389-94.
- [23] Aoki, Y, Niihori T, Narumi Y, et al. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat* 2008; 29(8): 992-1006.
- [24] Schubbert S, Bollag G, and Shannon K. Deregulated Ras signaling in developmental disorders: new tricks for an old dog. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17(1): 15-22.
- [25] Rodríguez-Santiago B., Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagn. Prenat.* 2012; 23(2):56-66.

Fecha: Mayo 2019	Código: GP-017/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 26 de 26
-------------------------	--	------------------------