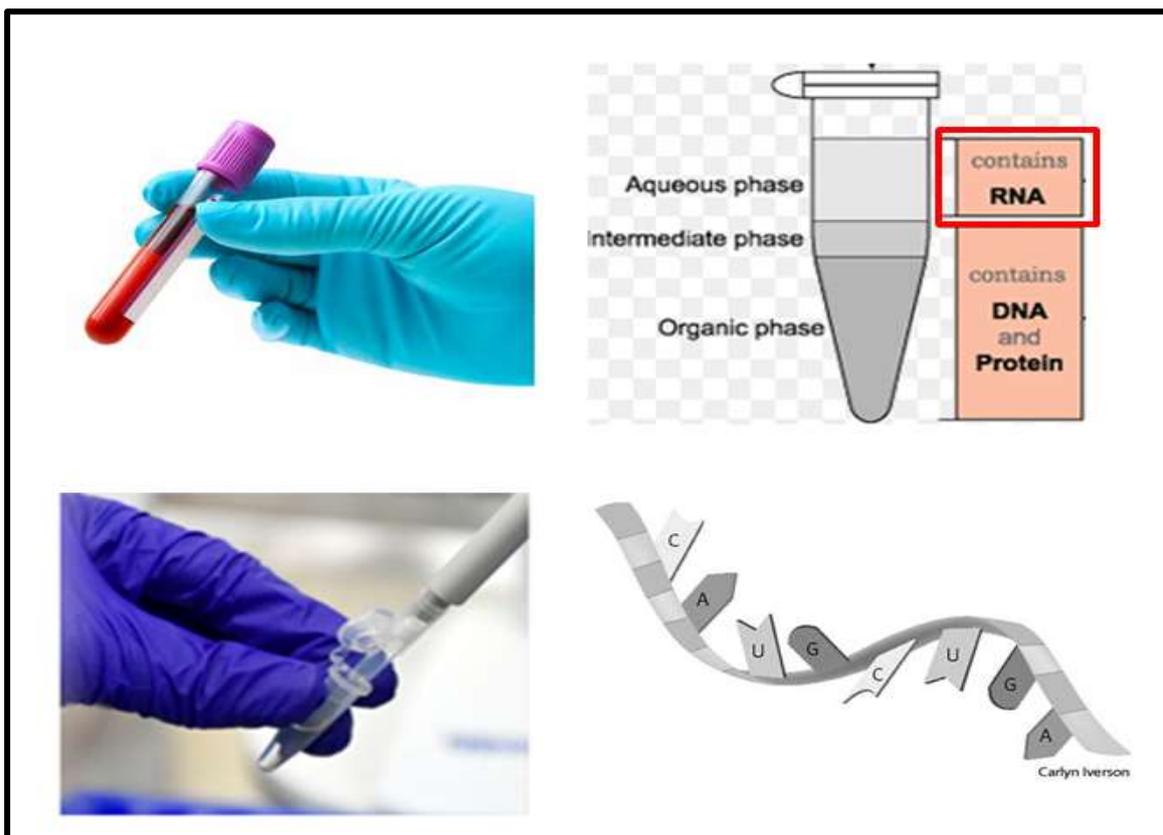


## GUÍA DE PROCEDIMIENTO

### EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA

UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO  
SUB UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO –GENÉTICA



Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico-Genética	<ul style="list-style-type: none"><li>• Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento</li><li>• Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico</li><li>• Unidad de Gestión de la Calidad</li></ul>	<b>Dra. Elizabeth Zulema Tomás Gonzales de Palomino</b> Directora del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja



**GUÍA DE PROCEDIMIENTO**  
**EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA**  
**ÓSEA**

- 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 CPMS ..... 4
- VI. Consideraciones Generales ..... 4
  - a. Definiciones Operativas ..... 4
    - 1. Definición del Procedimiento ..... 4
    - 2. Aspectos Epidemiológicos importantes ..... 4
    - 3. Consentimiento Informado ..... 4
  - b. Conceptos básicos ..... 4
  - c. Requerimientos básicos ..... 5
- VII. Consideraciones Específicas ..... 6
  - a. Descripción detallada del Procedimiento: ..... 6
  - b. Indicaciones ..... 8
    - 1. Indicaciones Absolutas ..... 8
    - 2. Indicaciones Relativas ..... 8
  - c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes ..... 8
  - d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes: ..... 8
  - e. Contraindicaciones ..... 8
- VIII. Recomendaciones ..... 8
- IX. Autores, Fecha y Lugar ..... 9
- X. Anexos ..... 10
- XI. Bibliografía ..... 12



## GUÍA DE PROCEDIMIENTO: EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA

### I. Título

Guía de Procedimiento: Extracción de ARN a partir de muestras de sangre periférica y médula ósea.

### II. Finalidad

Estandarizar la guía de procedimiento de extracción de ARN a partir de sangre y médula ósea entre el equipo técnico del Sub unidad de Soporte al Diagnóstico - Genética.

### III. Objetivos

#### a. Objetivos Generales

Estandarizar el procedimiento de extracción de ARN a partir de sangre y médula ósea entre el equipo técnico del Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico-Genética .

#### b. Objetivos Específicos

- Contribuir a disminuir la incidencia de complicaciones y errores derivados del procedimiento de Extracción de ARN a partir sangre periférica y médula ósea.
- Establecer los requerimientos básicos para obtener un resultado con estándares de calidad. .

### IV. Ámbito de aplicación

La presente Guía es de aplicación en la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento, específicamente la Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico, Especialidad de Genética del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja y hospitales de tercer nivel del Ministerio de Salud, que cuenten con el recurso humano y equipamiento necesario para realizar este procedimiento.



Guía de Procedimiento Extracción de ARN a partir de Sangre Periférica y Médula Ósea

La población objetivo se extiende a todos aquellos pacientes que requieran que sus muestras de sangre periférica sean procesadas para extraer ARN.

## V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPMS

Nombre del Procedimiento	Código CPMS
Extracción de ARN en sangre periférica y médula ósea	83891.03

## VI. Consideraciones Generales

### a. Definiciones Operativas

#### 1. Definición del Procedimiento

El procedimiento de extracción de ARN comprende el lisado de las células sanguíneas y la homogenización de la muestra para liberar el ARN, recuperación del ARN por separación de fases utilizando Trizol y cloroformo, precipitación con isopropanol, lavados en alcohol, y re suspensión en agua libre de nucleasas.

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.

#### 2. Aspectos Epidemiológicos importantes

No aplica.

#### 3. Consentimiento Informado

No aplica.

### b. Conceptos básicos

- **ARN: Ácido ribonucleico.**
- **Trizol:** Solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina utilizado para aislar ARN de alta calidad. La solución Trizol compuesta por los siguientes principios activos: Fenol (el cual es muy tóxico y volátil), hidroxiquinoleina (inhibidor de ARNasas), tiocianato de amonio, tiocianato de guanidina y glicerol.



### c. Requerimientos básicos

#### 1. Equipos Biomédicos

- Cabina de bioseguridad.
- Microcentrífuga refrigerada.
- Centrífuga de tubos de 15 mL.
- Vortex.
- Refrigeradora.
- Congeladora -20°C.

#### 2. Materiales Médicos no Fungibles

- Micro pipeta de 20–200  $\mu$ L.
- Micro pipeta de 100–1000  $\mu$ L.
- Rack para tubos de 2 y 15 mL.

#### 3. Materiales Médicos Fungibles

- Guantes de Nitrilo.
- Mandil de laboratorio.
- Mascarillas.
- Tubos de 1.5 y 15 mL.
- Puntas con filtro para micro pipetas de 200 y 1000  $\mu$ L.
- Pipeta de transferencia (Pasteur).
- Tubo con EDTA de 3 mL.
- Envase de descarte de material bio-contaminado.

#### 4. Reactivos de Laboratorio

- Buffer de lisis de glóbulos rojos.
- Trizol.
- Cloroformo.
- Alcohol Absoluto.
- Isopropanol.
- Agua de PCR.



## VII. Consideraciones Específicas

### a. Descripción detallada del Procedimiento:

#### 1. Recepción de la Muestra

- Se requiere por lo menos 3 mL de la muestra, la cual es colectada en un tubo con anticoagulante EDTA
- Recepción de la muestra y orden médica correspondiente.
- Verificar la información y evaluar la muestra.
- Colocar el código de laboratorio que le corresponde al tubo de muestra y a la orden médica.
- Conservar la muestra a 4 °C, con un tiempo máximo de 48 h

#### 2. Extracción de ARN (Ver Anexo 1)

- Limpiar la cabina de bioseguridad con alcohol al 96%.
- Prender la luz UV de la cabina por un lapso de 15 minutos.
- Rotular el tubo de 15 mL con el código de la muestra a trabajar.
- En un tubo de 15 mL agregar 9mL de buffer de lisis de glóbulos rojos y 3mL de la muestra.
- Homogenizar con la ayuda del vórtex e incubar por 15 minutos a 4°C.
- Centrifugar a 2,200 rpm por 12 min a temperatura ambiente.
- Remover el sobrenadante.
- Adicionar 3 mL de buffer de lisis al precipitado, homogenizar e incubar por 5 minutos a 4°C.
- Centrifugar a 2,200 rpm por 5 min a temperatura ambiente.
- Remover el sobrenadante.
- Adicionar 1 mL de Trizol y transferir con una pipeta Pasteur previa homogenización de la mezcla, a un tubo de 1.5 mL rotulado.
- Incubar a – 20°C hasta el día siguiente.
- Al día siguiente, colocar la muestra a temperatura ambiente hasta su descongelamiento.
- Adicionar 0.4 mL de cloroformo, y homogenizar en el vórtex por 15 segundos e incubar por 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. Se van a observar 3 fases. Transferir la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo de 1.5 mL rotulado.



## Guía de Procedimiento Extracción de ARN a partir de Sangre Periférica y Médula Ósea

- Adicionar 0.65 mL de isopropanol e incubar por 2 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En caso el pellet celular sea muy escaso incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche.
- Centrifugar a 12,000 rpm por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Remover el sobrenadante.
- Añadir 1 mL de etanol al 70% y homogenizar en el vórtex algunos segundos.
- Centrifugar a 10,000 rpm por 8 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Descartar el sobrenadante.
- Secar el pellet por 10 minutos y re suspender en 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.
- Homogenizar por pipeteo y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso para la cuantificación.

### 3. Cuantificación de ARN

- El procedimiento se lleva a cabo de acuerdo con protocolo del kit.
- Brevemente, preparar la solución de trabajo en un tubo de 1.5 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 muestra.
- Homogenizar suavemente e incubar por 2 min.
- Llevar los tubos al cuantificador y seleccionar la función respectiva del ensayo.
- 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 ARN purificado de la muestra.
- La concentración se expresa en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

### 4. Emisión y validación de resultado de extracción de ARN

Se emitirá el resultado de cuantificación y calidad del ARN en un documento que será validado por un médico genetista según formato adjunto en Anexo 2.

**b. Indicaciones****1. Indicaciones Absolutas**

- Estudio molecular que impliquen la expresión de genes debido a alteraciones genómicas somáticas a partir de ARN.

**2. Indicaciones Relativas**

- Pacientes que pertenecen a un protocolo de investigación aprobado por la Institución.
- Casos especiales colaborativos donde se requiera extracción de ARN para pruebas diagnósticas.

**c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes**

- Derrame del material biológico sobre las áreas de trabajo.
- Derrame de los reactivos sobre las áreas de trabajo.

**d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:**

Entrar en contacto directo con material biológico o reactivo, para lo cual se debe actuar de acuerdo con las normas de bioseguridad.

**e. Contraindicaciones**

No aplica.

**VIII. Recomendaciones**

- Las muestras deben contener aproximadamente 3.0 mL o más, de sangre periférica o médula ósea, y colectadas en un tubo con EDTA en condiciones estériles.
- Las muestras no deben tener coágulos, coágulos microscópicos o estar hemolizada.
- La muestra debe procesarse inmediatamente llegada al laboratorio, si en caso esto no fuera posible, guardar la muestra a 4 °C, con un tiempo máximo de 48h.

**IX. Autores, Fecha y Lugar****Nombre de Ejecutores responsables:**

MSc. Oscar Dávila Carlín

Biol. Francisco Sánchez Pinto

**Lugar del procedimiento:**Laboratorio de Genética Molecular – Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico-Genética  
Instituto Nacional de Salud del Niño-San Borja**Fecha de Elaboración y Vigencia**

Septiembre 2020

Vigencia: Dos años a partir de su aprobación mediante Resolución Directoral.

**Lista de Autores y correos electrónicos:**

Dra. Gioconda Manassero Morales	<a href="mailto:gmanassero@insnsb.gob.pe">gmanassero@insnsb.gob.pe</a>
Dra. Kelly Franco Bustamante	<a href="mailto:kfranco@insnsb.gob.pe">kfranco@insnsb.gob.pe</a>
Dr. Julio A. Poterico	<a href="mailto:jpoterico@insnsb.gob.pe">jpoterico@insnsb.gob.pe</a>
MSc. Oscar Dávila Carlín	<a href="mailto:odavila@insnsb.gob.pe">odavila@insnsb.gob.pe</a>
Biol. Francisco Sánchez Pinto	<a href="mailto:fsanchezp@insnsb.gob.pe">fsanchezp@insnsb.gob.pe</a>
Biol. Cindy Miranda Miranda	<a href="mailto:cmiranda@insnsb.gob.pe">cmiranda@insnsb.gob.pe</a>
Biol. Orson Mestanza Millones	<a href="mailto:omestanza@insnsb.gob.pe">omestanza@insnsb.gob.pe</a>
Susan Munive Goytizolo	<a href="mailto:smunive@insnsb.gob.pe">smunive@insnsb.gob.pe</a>

**X. Anexos****Anexo 1****Flujograma de Extracción de ARN**



PERÚ

Ministerio de Salud

Instituto Nacional de Salud del Niño – San Borja



## Guía de Procedimiento Extracción de ARN a partir de Sangre Periférica y Médula Ósea

### Anexo 2



"Año de la Lucha contra la Corrupción y la Impunidad"

#### SERVICIO DE GENÉTICA INFORME DEL ANÁLISIS DE GENÉTICA MOLECULAR

##### DATOS DEL PACIENTE

Nombre:	RODRIGUEZ AMPUERO JUAN HAMPIER	Código:	GM-19-003
Edad:	13 AÑOS	Historia Clínica:	7043638
Sexo:	M	Procedencia:	HOSP ESPEC PEDIA
Fecha de recepción de la muestra:	03/01/2019	Fecha del reporte:	07/01/2019
Medico Solicitante:	Dr. Mendoza Sauro		

##### CARACTERÍSTICAS DEL EXAMEN GENÉTICO

Tipo de muestra: MÉDULA ÓSEA

Metodología:\* La muestra remitida fue sometida a una solución monofásica de fenol y tiodenato de guanidina para facilitar la extracción del ARN (ácido ribonucleico). El ARN es resuspendido en agua grado biología molecular y almacenado a -20°C hasta su uso posterior.

##### RESULTADO:

EXTRACCION ARN: ACEPTABLE

CUANTIFICACION: 150 – 165 ng/μl



##### OBSERVACIÓN:

Se recibió un tubo de EDTA con 3mL de sangre periférica.

Analizado por:

Validado por:

**RAFAEL SANONCE BAYO**  
Biólogo Molecular  
CBP: 1233

**INSN** INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO SAN BORJA  
SERVICIO DE GENÉTICA

**RÚBRICA**

Médico Especialista en Genética  
CMP: 12345678

\* Anal. Biochem. 1987. 162:156-59.



## XI. Bibliografía

- 1.- Chomczynski, P. and Mackey, K. 1995. Substitution of chloroform by bromochloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal. Biochem.* 225:163-164.
- 2.- Chomczynski P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15:532-37.
- 3.- Chomczynski, P. 1992. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nucl. Acids Res.* 20:3791-3792.
- 4.- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- 5.- Chirgwin J M, Przybyla A E, MacDonald R J & Rutter W J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry— USA* 18:5294-9. 1979.
- 6.- Cox, R.A. 1968. The use of guanidine chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* 12:120-129.