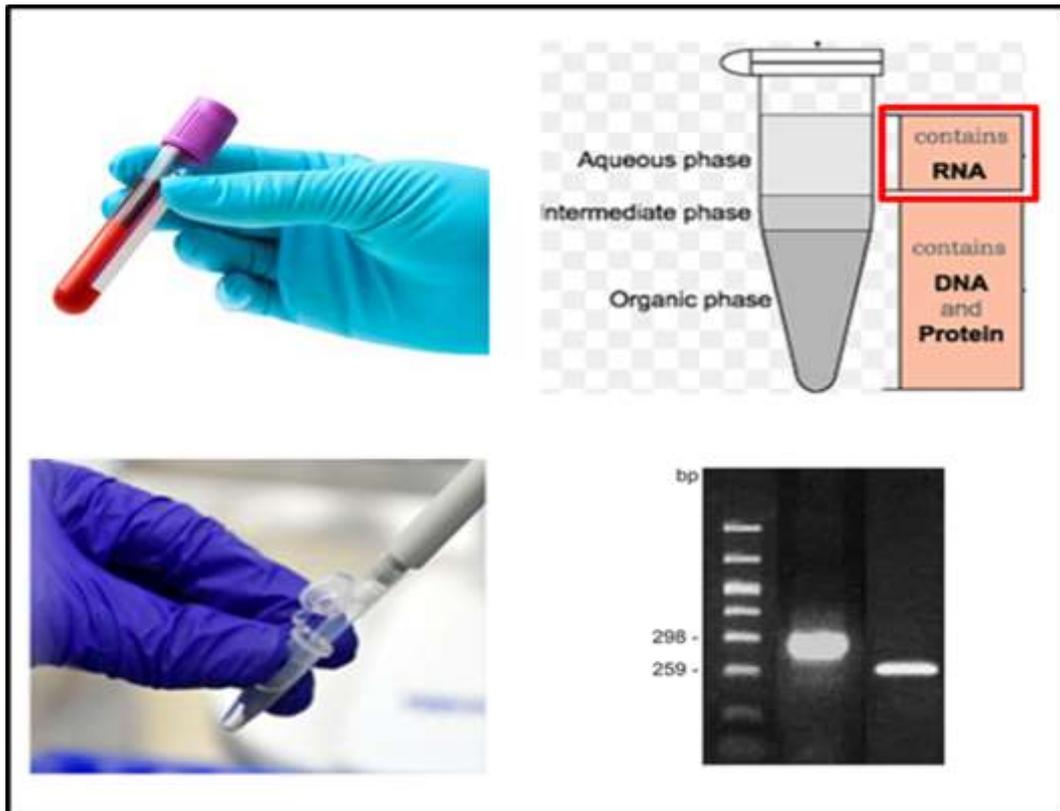


## GUÍA DE PROCEDIMIENTO

### PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROME DE FALLA MEDULAR EN LÍNEA GERMINAL

#### 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****PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROME DE FALLA MEDULAR EN LÍNEA GERMINAL**

I. Título .....	3
II. Finalidad .....	3
III. Objetivos .....	3
a. Objetivos Generales.....	3
b. Objetivos Específicos .....	3
IV. Ámbito de aplicación .....	4
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 .....	5
3. Consentimiento Informado.....	5
b. Conceptos básicos.....	6
c. Requerimientos Básicos .....	6
VII. Consideraciones Específicas.....	8
a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:.....	8
b. Indicaciones.....	14
1. Indicaciones Absolutas .....	14
2. Indicaciones Relativas.....	15
c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes .....	15
d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:.....	15
e. Contraindicaciones .....	15
VIII. Recomendaciones .....	16
IX. Autores, Fecha y Lugar.....	16
X. Anexos.....	17
XI. Bibliografía.....	23



## **GUÍA DE PROCEDIMIENTO**

### **PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROME DE FALLA MEDULAR EN LÍNEA GERMINAL**

#### **I. Título**

Guía de Procedimiento: Panel Molecular para Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal.

#### **II. Finalidad**

Contribuir a la mejora continua de los servicios de salud del INSN-SB, garantizando la calidad en el desarrollo del Procedimiento: Panel Molecular para Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal

#### **III. Objetivos**

##### **a. Objetivos Generales**

Estandarizar el procedimiento mediante técnicas de secuenciación de siguiente generación (NGS) de Panel Molecular para Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal por la Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico - Genética del Instituto Nacional del Niño de San Borja.

##### **b. Objetivos Específicos**

- Realizar al diagnóstico de enfermedades genéticas cuya presentación clínica es el Fallo Medular, que incluyen: las Anemias Aplásicas, Síndromes Mielodisplásicos y otras enfermedades genéticas candidatos a Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos.
- Contribuir al manejo individualizado de los pacientes con Fallo Medular en línea germinal, esto implica tratamientos médicos, hematológicos, quimioterapias y/o Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos.
- Describir el proceso pre analítico de las muestras, así como el proceso de secuenciación de siguiente generación (NGS), el manejo de los archivos genómicos ya secuenciados y la interpretación de variantes genéticas.

#### IV. **Ámbito de aplicación**

La presente Guía de Procedimiento es de aplicación en la Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico - Genética, en los pacientes de edad pediátrica con diagnóstico de Síndrome de Falla Medular, el cual incluye: Anemia Aplásica, Síndrome Mielodisplásicos y otras enfermedades hematológicas de etiología genética; condiciones que son candidatas a Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos en el Instituto Nacional del Niño de San Borja o de un establecimiento de salud del tercer nivel del MINSA.

La presente guía se aplicará a pacientes de edad pediátrica con sospecha de Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal, a nivel nacional.

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

Nombre del Procedimiento	Código CPMS
Panel Molecular para Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal.	<b>81479.02</b>

#### VI. **Consideraciones Generales**

La clasificación de síndromes de fallo medular actualmente se rige básicamente por marcadores genéticos, y el conocimiento de qué genes se encuentran mutados es de suma relevancia para hacer un diagnóstico preciso, así como para estratificar y realizar un manejo de medicina personalizada.

##### a. **Definiciones Operativas**

##### 1. **Definición del Procedimiento**

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

Comprende las etapas de: toma/recepción de la muestra, extracción de ADN, cuantificación de ADN, análisis de integridad genómica, inclusión de adaptadores para secuenciamiento, el secuenciamiento propiamente dicho; y la aplicación de la tecnología de secuenciamiento de siguiente generación (NGS) para el manejo bioinformático con la consecuente interpretación de variantes, correlación genotipo-



fenotipo, informe final y validación del informe final por médico especialista en genética.

## 2. Aspectos Epidemiológicos importantes

El Síndrome de Falla Medular en línea germinal incluye un conjunto de enfermedades hematológicas de origen genético que pueden expresarse como: Anemia Aplásica, Síndrome Mielodisplásicos y/o enfermedades oncohematológicas.

La incidencia de la Anemia Aplásica es de dos casos por un millón de personas al año, en el Perú se deberán diagnosticar aproximadamente 60 casos nuevos por año, en la edad pediátrica el 40% de ellas es de causa genética hereditaria, hablaríamos de 24 casos nuevos cada año. (1-3)

Los Síndromes Mielodisplásicos tienen una incidencia de 4.1 por cada 100,000 personas al año, en el Perú se deberán diagnosticar aproximadamente 300 casos nuevos por año, en la edad pediátrica el 40% de ellas es de causa genética hereditaria, hablaríamos de 120 casos nuevos cada año. (4-10)

## 3. Consentimiento Informado

Todo paciente que sea sometido al Procedimiento: Panel Molecular para Síndrome de Falla Medular 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 genetista, 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

- **Síndrome de Falla medular:** Conjunto de enfermedades hematológicas, con alteración en el número y función de las células pluripotenciales hematopoyéticas o del microambiente medular, que pueden ser de origen genético. Estos síndromes pueden expresarse como: Anemia Aplásica, Síndrome Mielodisplásicos y/o enfermedades oncohematológicas.
- **Anemia Aplásica:** Presencia de pancitopenia en sangre periférica acompañada de hipo celularidad en médula ósea, la cual es reemplazada por grasa, en ausencia de procesos clonales malignos. Cuya historia natural puede iniciarse con: anemia, neutropenia y trombocitopenia.
- **Síndromes Mielodisplásicos (SMD):** constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades clonales (neoplásicas), adquiridas de las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea, que se caracterizan por una hematopoyesis inefectiva con alteraciones funcionales y morfológicas de los progenitores, desarrollo de citopenias periféricas y la posibilidad de evolucionar a leucemia mieloide aguda.
- **Secuenciamiento de nueva generación - NGS:** Tecnología que se utiliza actualmente para determinar secuencias de ADN que presenta ventajas en comparación al secuenciamiento de Sanger. Las siglas NGS significan Next Generation Sequency. Esta es la tecnología empleada en el Procedimiento: Panel Molecular para Síndrome Falla Medular 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.

## c. Requerimientos Básicos

### 1. Equipos Biomédicos

- Cabina de Bioseguridad.



- Refrigeradora.
- Termociclador.
- Cámara Electroforética.
- Cámara fotográfica.
- Congeladora -20°C.
- Microcentrífuga.
- Vórtex.
- Centrifuga de placa.
- Placa magnética
- Equipo de secuenciación masivo.
- Cuantificador de ADN.

## **2. Materiales Médicos no Fungibles**

- Micro pipeta mono canal de 0.1–2 µL.
- Micro pipeta mono canal de 0.5–10 µL.
- Micro pipeta mono canal de 2–20 µL.
- Micro pipeta mono canal de 20–200 µL.
- Micro pipeta mono canal de 100–1000 µL.
- Micro pipeta Multicanal de 0.5 – 10 µL.
- Micro pipeta 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 equipo de secuenciación.
- Cubiertas de plástico para placas de 96 pozos.

## **4. Reactivos de Laboratorio**



## Guía de Procedimiento: Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal

- Kit de reactivos para secuenciamiento de panel molecular de falla medular en línea germinal.
- 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.
- Verificar que se cuente con el consentimiento informado firmado por los padres o por el tutor del menor.
- Verificar la información.
- Evaluar condiciones de la muestra.
- Colocación del código de laboratorio que le corresponde tanto al tubo de muestra y a la orden médica.

**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 uL 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.
- Re suspender en 200 uL de PBS 1X.
- Proceder al protocolo de extracción.

### 3. Extracción de ADN

- Añadir 20 uL de solución de proteinasa K a los 200 µL del proceso anterior, mezclar por vórtex por 10 seg.
- Agregar 400 µL de solución de lisis, mezclar bien agitando en vórtex o pipeteando para obtener una suspensión uniforme.
- Incubar la muestra a 56 °C durante 30 minutos en el termo bloque mientras se agita de vez en cuando.
- Agregar 200 µL de etanol (96-100%) y mezclar por pipeteo.
- Transferir la mezcla preparada a la columna de spin (columna de sílica).
- Centrifugar durante 1 minuto a 6.000 x g (~ 8,000 RPM).
- Desechar el tubo de recolección. Poner la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 mL.
- Añadir 500 µL de Buffer de lavado I.
- Centrifugar durante 1 min a 8,000 x g (~ 10,000 rpm). Desechar el tubo colector y colocar la columna en un tubo de recolección nuevo.
- Añadir 500 µL de Buffer de lavado II a la columna.
- Centrifugar para 3 minutos a la velocidad máxima ( $\geq 20,000$  x g o  $\geq 14,000$  RPM).
- Desechar el tubo de recolección transferir la columna a un tubo rotulado de micro centrífuga de 1,5 mL.
- Añadir 50 µL de buffer de elución al centro de la membrana de la columna para eluir el genoma del ADN.
- Incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar durante 1 minuto a 8,000 x g (~ 10,000 RPM).
- Desechar la columna de sílica.
- Almacenar a -20°C hasta su posterior uso para la cuantificación.

### 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 uL de ADN más 2 uL de safe green en los pozos del gel.
- Adicionar el marcador de peso molecular.

#### Guía de Procedimiento: Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal

- Iniciar la corrida de electroforesis a 90 voltios por 30 minutos aproximadamente.
- Visualizar el gel en el trans iluminador y tomar una foto para ver la viabilidad del ADN (ver figura 1).

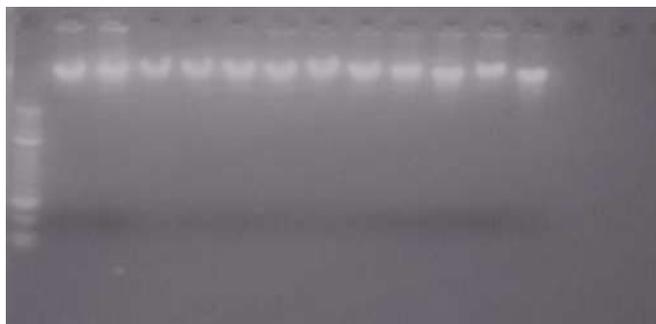


Figura 1: Se comprueba que las muestras de ADN están viables para el NGS.

#### 5. Cuantificación de ADN:

- La cuantificación se llevará a cabo mediante un kit de cuantificación
- Preparar la solución de trabajo en un tubo de 2 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 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 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  $4 \text{ ng}/\mu\text{L}$ :

#### 6. Amplificación del ADN:

- En un tubo de PCR agregar  $5 \mu\text{L}$  del 5X Mix de Amplificación

## Guía de Procedimiento: Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal

- Adicionar 7.5 uL de la muestra de ADN.
  - Este volumen de 12.5 se divide en dos pozos (pozo1 y pozo 2), 5 uL x pozo en la placa de PCR.
  - Adicionar 5 uL del pool 1 de primers al pozo 1.
  - Adicionar 5 uL del pool 2 de primers al pozo 2.
  - Se hace el PCR con 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:**

- Juntar ambos productos de PCR del paso anterior en un solo pozo.
  - Adicionar 2 uL del reactivo FuPa.
  - Se hace la siguiente corrida en el termociclador con las 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:**

- En una placa colocar los siguientes reactivos respetando el orden.
  - 22 uL del producto de la digestión.
  - 4 uL de reactivo Switch Solution.
  - 2 uL del reactivo Amplificación CD Indexes.
  - 2 uL del reactivo DNA Ligasa. Volumen total de 30 uL.
  - Se hace la siguiente corrida en el termociclador con las 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 uL de perlas magnéticas (beads).



#### Guía de Procedimiento: Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal

- Mezclar bien con la micro pipeta.
- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Colocar la placa en el soporte magnético.
- Incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
- Remueva el sobrenadante de cada pozo, evite llevarse las perlas.
- Adicionar 150 uL de etanol al 70% que se haya preparado al momento.
- Incubar por 30 segundos.
- Descartar el sobrenadante.
- 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.

#### 10. Amplificación de la librería:

- Adicionar 45 uL del reactivo 1X Mix para amplificación de librerías.
  - Adicionar 5 uL del reactivo 10X Primers para amplificación de librerías.
  - Se hace el PCR con 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 uL de perlas magnéticas (beads).
- Mezclar bien la solución con la micro pipeta.
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Colocar la placa en el soporte magnético.
- Incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir el sobrenadante a una nueva placa (aproximadamente 75 uL).
- Adicionar 60 uL de perlas magnéticas (beads).
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Colocar la placa en el soporte magnético.
- Incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
- Descartar el sobrenadante.

## Guía de Procedimiento: Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal

- Adicionar 150 uL de etanol al 70% que se haya preparado al momento.
- Incubar por 30 segundos.
- Descartar el sobrenadante.
- Repetir el lavado anterior con etanol 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 uL del reactivo Low TE y cubrir la placa.
- Mezclar bien con la micro pipeta.
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Colocar la placa en el soporte magnético.
- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir 27  $\mu$ L del sobrenadante a una nueva placa, evite llevarse las perlas magnéticas.

**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 nMolar y un volumen final de 10 uL.
- Se usa la siguiente fórmula:

		$A \text{ ng/uL} \times 10^6$
<b>Molaridad (nM)</b>	=	-----
		$660 \text{ g/mol} \times N$

**Dónde:****A = Concentración de librería en ng/uL (Se obtiene del cuantificador)****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 equipo secuenciador:**

## Guía de Procedimiento: Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal

- Todos los productos normalizados a 2nM se junta en un solo pool de todas las muestras.
- De este pool se mezcla 2.5 uL más 17.5 uL de buffer Low TE.
- Este volumen final de 20 uL se coloca en el cartucho del equipo de secuenciamiento.
- Colocar el cartucho en la máquina y empezar la corrida de secuenciamiento.
- La corrida dura aproximadamente 17 horas.
- Cuando haya concluido la corrida se saca los archivos de la máquina para que sean analizados:

**14. Análisis del Resultado:**

- Análisis mediante el software específico del Secuenciador.(Ver Anexo 2)
- Identificación y codificación de la muestra, informe de alineamiento, filtrado de métricas y variantes obtenidas (Ver Anexo 2)
- Obtención y almacenamiento de los resultados obtenidos en la base de datos Spacehub.

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

Este procedimiento de panel de genes (Ver Anexo 3) está dirigido a población pediátrica con:

- Hipoplasia o aplasia medular progresiva.
- Anemia aplásica severa.
- Anemia aplásica con defectos del eje radial.
- Eritroblastopenia pura primaria que se haya descartado ser de tipo secundaria (causas inmunológicas, infecciosas, medicamentosa, entre otras).
- Síndrome mielodisplásico
- Trombocitopenia severa (<70,000 plaquetas/mm<sup>2</sup>) y plaquetas de pequeño que se haya descartado ser de tipo secundaria (causas inmunológicas, infecciosas, medicamentosa, entre otras).
- Neutropenia congénita severa. que se haya descartado ser de tipo secundaria (causas inmunológicas, infecciosas, medicamentosa, entre otras).
- Anemia de Fanconi.

## Guía de Procedimiento: Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal

- Osteopetrosis.
- Síndromes de Inestabilidad Cromosómica.

Es importante remarcar que: aunque el procedimiento se realiza en primera instancia en la población pediátrica con alguna condición enmarcada dentro del diagnóstico de Síndrome de Falla medular, no se excluye que por necesidad de interpretación de la(s) variante(s) genética(s) que se identifique(n), pudiese ser necesario extender el procedimiento a uno o más familiares de primer grado con el objetivo de realizar la correlación e interpretación clínico-molecular en el paciente y sus familiares para realizar una adecuada asesoría genética y el subsecuente manejo terapéutico que de este análisis se derive.

## 2. Indicaciones Relativas

- Fenotipo sugestivo de las siguientes enfermedades:

Anemia de Fanconi, Anemia Diamond-Blackfan, Disqueratosis congénita, Trombocitopenia amegacariocítica CAMT, Síndrome de Shwachman Diamond, Síndrome Nijmegen Breakage, Ataxia-Telangiectasia, Síndrome de Bloom, Anemia A plástica aislada hereditaria, Síndromes de predisposición a Neoplasia Mieloides, Thrombocytopenia-absent radius, Síndrome Li-Fraumeni, Osteopetrosis, Síndrome LIG4, Disgenesis Reticular, Síndrome de Werner, Neutropenia Congénita Severa y Síndrome de Wiskott-Aldrich.

### c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes

Dentro de las complicaciones frecuentes de este examen tenemos a aquellas relacionadas a la venopunción luego de la extracción de sangre periférica, como leve dolor y equimosis en zona de venipuntura.

### d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:

La Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico-Genética del INSN-SB, manejará la información genómica y clínica con estricta confidencialidad y con codificación de las muestras de sangre en el área de genética molecular. De esta manera se reducirá el riesgo, que infrecuente pero presente, existe en cuanto a la privacidad y confidencialidad de los datos del paciente y su familia

### e. Contraindicaciones



Ninguna, en tanto responda al requerimiento enmarcado en las indicaciones absolutas o relativas.

## VIII. Recomendaciones

- Es necesario cumplir con las indicaciones de la guía de procedimientos siguiendo protocolos de buenas prácticas de Laboratorio.
- Las muestras deben contener aproximadamente 3.0 mL de sangre periférica. En ocasiones se solicitará muestras biológicas de otro tipo: por ejemplo, fibroblastos obtenidos en piel.
- Las muestras deben ser colocadas en un Tubo BD con EDTA (tapa lila) en condiciones estériles, sin coágulos ni hemólisis.
- Describir las eventualidades al realizar la prueba, en el cuadro de observaciones.

## IX. Autores, Fecha y Lugar

### Nombre de Ejecutores responsables:

Dra. Gioconda Manassero Morales

### 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

Noviembre 2020

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

### Lista de Autores y correos electrónicos:

Dr. Luis Celis García	lcelis@insnsb.gob.pe
Dra. Nathaly Caballero Bedón	ncaballero@insnsb.gob.pe
Dra. Kelly Franco Bustamante	kfranco@insnsb.gob.pe
Dr. Julio A. Poterico	jpoterico@insnsb.gob.pe
MSc. Oscar Dávila Carlín	odavila@insnsb.gob.pe
Biol. Francisco Sánchez Pinto	fsanchezp@insnsb.gob.pe
Biol. Cindy Miranda Miranda	cmiranda@insnsb.gob.pe
Biol. Orson Mestanza Millones	omestanza@insnsb.gob.pe
Susan Munive Goytizolo	smunive@insnsb.gob.pe



## X. Anexos

### ANEXO N°1

#### **CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROME DE FALLA MEDULAR EN LÍNEA GERMINAL**

(DS.N°027-2015-SA. Reglamento de la Ley N°29414. Ley que establece los Derechos de las Personas Usuarías de los Servicios de Salud. Ley General de Salud N° 26842. RD N° ...../2020/INSNSB)

**Nombre del Procedimiento: Panel Molecular para Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal**

**Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico - Genética**

#### **Diagnóstico**

Diagnóstico de Síndrome de Falla Medular, el cual incluye: Anemia Aplásica, Síndrome Mielodisplásicos y otras enfermedades hematológicas de etiología genética; condiciones que son candidatas a Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos

#### **Descripción del Procedimiento**

Se obtendrá una muestra de 3 mL de sangre periférica, como se realiza en otras pruebas genéticas de rutina. A partir de esa muestra de sangre, se extraerá el ácido desoxirribonucleico (ADN), del que se analizarán los genes relacionados con el Síndromes de Falla Medular de probable origen genético.

En algunos casos será necesario otro tipo de muestra biológica, como piel, saliva, folículo piloso, entre otros.

#### **Objetivo del Procedimiento**

Evaluar los cambios en los genes con el Síndromes de Falla Medular de probable origen genético.

El panel Molecular para Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal es el análisis de los genes asociados a alguna condición hematológica de causa genética y en ocasiones heredable; por lo que es necesario analizar los genes del paciente y/o familiar de primer grado.

#### **Beneficios Esperados**

Precisar el diagnóstico de sospecha en un tiempo relativamente corto, para realizar las intervenciones oportunas de tratamiento como el trasplante de progenitores hematopoyéticos a los pacientes y familiares (hermanos); entre otros. De la misma forma, establecer las medidas de prevención en el paciente y la familia.

#### **Riesgos o Complicaciones Frecuentes**

El proceso de extracción de sangre o biopsia de otro tejido puede causar un leve dolor o un pequeño moretón en zona de punción.

#### **Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes**

Aunque su información será guardada con total confidencialidad y con una codificación interna, no podemos garantizar la privacidad de sus datos al 100% (ver Anexo 1: Protección de datos). Por otro lado, existe la posibilidad que se encuentren hallazgos incidentales (ver Anexo 1: Hallazgos Incidentales). Pocas veces suceden retrasos en la entrega de resultados o equivocaciones en la entrega de resultados por motivos logísticos, tales como: error en el envío de muestra, equivocación de la codificación, mala calidad de muestra, entre otros.

**Consecuencias previsibles de la NO realización del procedimiento**

Al no definirse el diagnóstico, no se realizarían las intervenciones, en forma óptima, de los posibles problemas asociados a la condición genética; también se pierde la oportunidad de hacer prevención en otros familiares del paciente.

**Describir posibilidad de Tratamiento Alternativo**

El tratamiento corresponderá de acuerdo a los resultados y el criterio del médico tratante. De la misma forma, la prevención y asesoría genética estará a cargo de los médicos genetistas.

**Riesgos en Función de las Particularidades del Paciente:**

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

**Pronóstico:** El pronóstico varía según el resultado asociado a una enfermedad y el tipo alteración genética encontrada el paciente, y se discutirá con el médico tratante.

**• ¿Cuáles son los tipos de resultados que puedo obtener?**

**1. Resultado positivo:** se encontró un cambio en un gen asociado a una enfermedad, realizada en el Panel Molecular para Síndromes de Falla Medular, en Línea Germinal.

**2. Resultado negativo:** ausencia de hallazgo significativo asociado a una enfermedad, realizada en el Panel Molecular para Síndromes de Falla Medular, en Línea Germinal.

**3. Resultado incierto:** el hallazgo encontrado aún es difícil de interpretar hasta la fecha por la literatura científica y los especialistas en el mundo.

**4. Hallazgo incidental:** si el paciente tiene una sospecha de una enfermedad "X" y luego se identifica que es portador de un cambio anormal en el gen "Y" que quizás sea de importancia clínica para el paciente o sus familiares.

**• ¿Qué debo esperar ante un resultado negativo?**

El resultado negativo no descarta del todo que el paciente no tenga una enfermedad con causa genética, y si se sigue sospechando de la condición planteada inicialmente; se sugiere un estudio con otras metodologías diagnósticas.

**• ¿Qué debo esperar ante un resultado incierto?**

El resultado incierto no descarta que el paciente no tenga una enfermedad. Los expertos en el mundo sugieren una revisión cada cierto tiempo de este tipo de cambios genéticos, de acuerdo a la literatura existente.

**• ¿Qué debo esperar ante un resultado incidental?**

El hallazgo incidental puede ayudar al paciente y a su familia; por más que no tenga una relación directa con la enfermedad actual del paciente.

**• ¿Qué más se puede hacer si el resultado de esta prueba no determina la enfermedad?**

Si el resultado de la prueba brindada no puede determinar la enfermedad, existen otros métodos de diagnóstico actuales que se deben discutir con su médico genetista.

**Recomendaciones/Observaciones:**

El asesoramiento post test debe ser realizado por un Médico Especialista en Genética 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: Panel Molecular para Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal**, sobre el cual he sido informado. Así mismo he comprendido los beneficios, probables riesgos o complicaciones y las limitaciones de la prueba genética que se realizará.

Por lo tanto con la información completa, oportuna y sin presión; yo, voluntaria y libremente: **Doy mi Consentimiento para el Procedimiento: Panel Molecular para Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal**

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



Huella Digital

\_\_\_\_\_  
**Firma del Representante Legal**

Nombre \_\_\_\_\_

DNI N° \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Firma del Médico Responsable**

CMP N° \_\_\_\_\_

RNE N° \_\_\_\_\_

**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: Panel Molecular para Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal** y asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida de mi representado.

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



Huella Digital

\_\_\_\_\_  
**Firma del Representante Legal**

Nombre \_\_\_\_\_

DNI N° \_\_\_\_\_

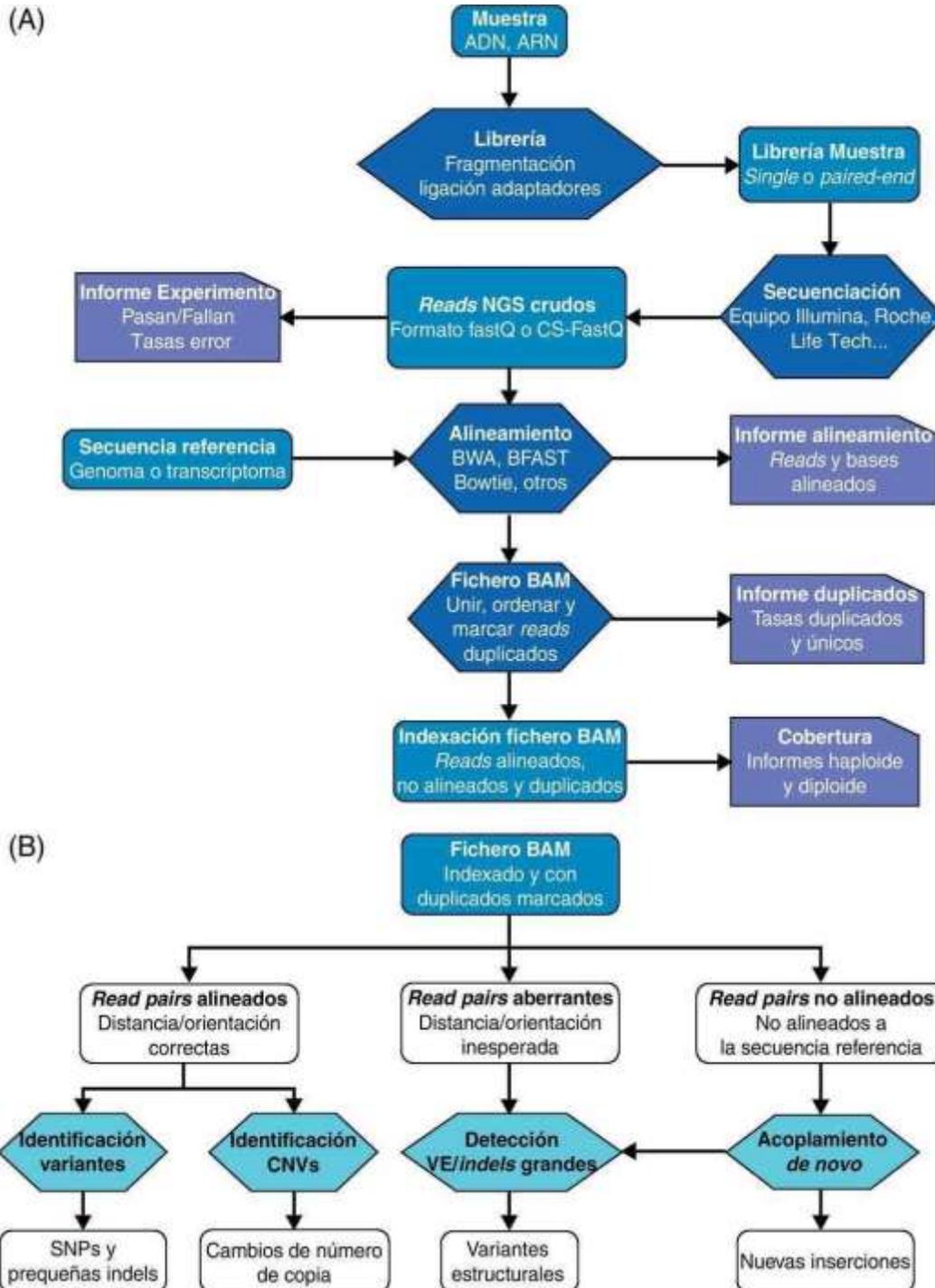
\_\_\_\_\_  
**Firma del Médico Responsable**

CMP N° \_\_\_\_\_

RNE N° \_\_\_\_\_

## ANEXO N°2

## ALGORITMO DE TRABAJO Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS HASTA LA INTERPRETACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS



## ANEXO N°3

PROCEDIMIENTO: PANEL MOLECULAR PARA SÍNDROME DE FALLA MEDULAR  
EN LÍNEA GERMINAL (CPMS 81479.02)

## 1. GENES ASOCIADOS A ANEMIA APLÁSICA Y DE RELEVANCIA PARA TPH

<b>Fanconi Anemia</b>	<b>Diamond-Blackfan Anemia</b>
1. FANCA 2. FANCB 3. FANCC 4. FANCD1 (BRCA2) 5. FANCD2 6. FANCE 7. FANCF 8. FANCG 9. FANCI 10. FANJ( BRIP1) 11. FANCL 12. FANCM 13. FANCN (PALB2) 14. FANCO (RAD51C) 15. FANCP (SLX4) 16. FANCQ (ERCC4) 17. FANCR (RAD51) 18. FANCT (UBET2) 19. FANCU(XRCC2) 20. FANCV (MAD2L2/REV7)	1. GATA1 2. RPL11 3. RPL15 4. RPL26 5. RPL27 6. RPL31 7. RPL35A 8. RPL5 9. RPS10 10. RPS17 11. RPS19 12. RPS24 13. RPS26 14. RPS27 15. RPS28 16. RPS29 17. RPS7 18. TSR2
<b>Disqueratosis congenital</b>	<b>Amegakaryocytic Thrombocytopenia, Congenital; Camt</b>
1. ACD 2. CTC1 3. DKC1 4. NHP2 5. NOP10 6. PARN 7. RTEL1 8. TERC 9. TERT 10. TINF2 11. WRAP53 12. C16orf57 ó USB1	MPL
	<b>Shwachman Diamond</b>
	SBDS

## 2. GENES ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD DE ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS

<b>Síndrome de labilidad genómica Nijmegen</b>	<i>NBS1</i>
<b>Síndrome Ataxia-Telangiectasia</b>	<i>ATM</i>
<b>Síndrome Bloom</b>	<i>RECQL3</i>
<b>Predisposición a LMA</b>	<i>RUNX1</i> <i>ANKRD26</i> <i>DDX41</i> <i>ETV6</i> <i>CEBPA</i>
<b>Disgenesia Reticular</b>	<i>AK2</i>
<b>Neutropenia Congénita Severa</b>	<i>ELA2</i> <i>GFI1</i> <i>HAX-1</i>
<b>Predisposición a Anemia Aplásica</b>	<i>SRP72</i> <i>TERC</i> <i>TERT</i> <i>GATA 2</i> <i>DNAJC21</i> <i>ERCC6L2</i>
<b>Síndrome Trombocitopenia, radio ausente (TAR)</b>	<i>RBM8A</i>
<b>Síndrome asociado a <i>LIG4</i></b>	<i>LIG4</i>
<b>Síndrome Werner</b>	<i>RECQL2</i>
<b>Síndrome Wiskott-Aldrich</b>	<i>WAS</i>
<b>Síndrome Li-Fraumeni</b>	<i>TP53</i>



## XI. Bibliografía

1. Young NS. Acquired aplastic anemia. *Ann Intern Med* 2002; 136:534.
2. Young NS, Kaufman DW. The epidemiology of acquired aplastic anemia. *Haematologica* 2008; 93:489.
3. Hideki M, Yusuke O. Clinical utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes. *Genetics in Medicine* 2017; 19:796–802 (2017).
4. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood* 2008; 112:45.
5. Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010; 116:3724.
6. Smith A, Howell D, Patmore R, et al. Incidence of haematological malignancy by subtype: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 2011; 105:1684.
7. De Roos AJ, Deeg HJ, Onstad L, et al. Incidence of myelodysplastic syndromes within a nonprofit healthcare system in western Washington state, 2005-2006. *Am J Hematol* 2010; 85: 765.
8. Cogle CR, Craig BM, Rollison DE, List AF. Incidence of the myelodysplastic syndromes using a novel claims-based algorithm: high number of uncaptured cases by cancer registries. *Blood* 2011; 117:7121.
9. McQuilten ZK, Wood EM, Polizzotto MN, et al. Underestimation of myelodysplastic syndrome incidence by cancer registries: Results from a population-based data linkage study. *Cancer* 2014; 120:1686.
10. Goldberg SL, Chen E, Corral M, et al. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. *J Clin Oncol* 2010; 28:2847.
11. AmpliSeq for Illumina On-Demand, Custom and Community Panels. Reference Guide. 2018.
12. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenat.* abril de 2012; 23(2):56-66.



PERÚ

Ministerio  
de Salud

Instituto Nacional de Salud  
del Niño – San Borja



Guía de Procedimiento: Síndrome de Falla Medular en Línea Germinal