

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DEL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DR. RUBÉN LISKER
YOURKOWITZKY

OCTUBRE 2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Índice		HOJA: 2 DE: 24

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN		3
I. OBJETIVO DEL MANUAL		4
II. MARCO JURÍDICO		5
III. LINEAMIENTOS DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE GENÉTICA EN LAS ÁREAS DE CITOGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR		16
IV. RECOMENDACIONES ANTE LA PANDEMIA DE COVID-19		18
GUÍA PARA EL MANEJO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA EN LAS ÁREAS DE CITOGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR		18
V. INSTRUCCIONES OPERATIVAS:		24
1. TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS		
2. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS		
3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA		
4. CARIOTIPO		
5. HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDAS FLUORESCENTES “FISH”		
6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA		
7. DISCRIMINACIÓN ALÉLICA CON SONDAS TAQMAN		
8. SECUENCIACIÓN DE SANGER DE ADN		

AUTORIZACIÓN

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Introducción		HOJA: 3 DE: 24

INTRODUCCIÓN

La elaboración de este manual tiene como propósito protocolizar los procedimientos que realizan las servidoras y/o los servidores públicos del Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky en la ejecución de los procedimientos técnicos del Laboratorio de Genética en las áreas de Citogenética y Biología Molecular para cubrir los requerimientos de las personas beneficiarias del Instituto y de otras instituciones de salud.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Objetivo del Manual		HOJA: 4 DE: 24

I. OBJETIVO DEL MANUAL

Proporcionar a las servidoras y/o los servidores públicos del Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky un documento que facilite el desarrollo, sistematizado y estandarización de los procedimientos técnicos que se realizan en las áreas de Citogenética y Biología Molecular.

El presente manual tiene que aplicarse en todas las actividades que se desarrollen en el laboratorio de Citogenética y Biología Molecular y se encuentra al alcance de las servidoras y los servidores públicos operativos de las áreas correspondientes.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Marco Jurídico		HOJA: 5 DE: 24

II. MARCO JURÍDICO

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.
D. O. F. 5-II-1917 y sus reformas

LEYES

Ley General de Salud.
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.
D.O.F. 26-V-2000 y sus reformas

Ley Orgánica de la Administración Pública Federal.
D.O.F. 29-XII-1976 y sus reformas

Ley Federal de las Entidades Paraestatales.
D.O.F. 14-V-1986 y sus reformas

Ley de Planeación.
D.O.F. 05-I-1983 y sus reformas

Ley General para el Control del Tabaco.
D.O.F. 30-V-2008 y sus reformas

Ley General de Protección Civil.
D.O.F. 06-VI-2012 y sus reformas

Ley General de Archivos.
D.O.F. 15-VI-2018

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.
D.O.F. 04-I-2000 y sus reformas

Ley Federal de Remuneraciones de los Servidores Públicos.
D.O.F. 19-V-2021

Ley Federal del Trabajo.
D.O.F. 01-IV-1970 y sus reformas

Ley Federal de los Trabajadores al Servicio del Estado, Reglamentaria del Apartado B) del Artículo 123 Constitucional.
D.O.F. 28-XII-1963 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Marco Jurídico		HOJA: 6 DE: 24

Ley General de Transparencia y Acceso a la Información Pública.
D.O.F. 04-V-2015 y sus reformas

Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública.
D.O.F. 09-V-2016 y sus reformas

Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados.
D.O.F. 26-I-2017

Ley General del Sistema Nacional Anticorrupción.
D.O.F. 18-VII-2016 y sus reformas

Ley Federal para Prevenir y Eliminar la Discriminación.
D.O.F. 11-VI-2003 y sus reformas

Ley General para la Inclusión de las Personas con Discapacidad.
D.O.F. 30-V-2011 y sus reformas

Ley de los Derechos de las Personas Adultas Mayores.
D.O.F. 25-VI-2002 y sus reformas

Ley General para la Igualdad entre Mujeres y Hombres.
D.O.F. 02-VIII-2006 y sus reformas

Ley General de Acceso de las Mujeres a una Vida Libre de Violencia.
D.O.F. 01-II-2007 y sus reformas

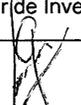
Ley Federal de Austeridad Republicana.
D.O.F. 19-XI-2019

Ley de Ciencia y Tecnología.
D.O.F. 05-VI-2002 y sus reformas

Ley Federal del Derecho de Autor.
D.O.F. 24-XII-1996 y sus reformas

Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial.
D.O.F. 01-VII-2020

Ley de Infraestructura de la Calidad.
D.O.F. 01-VII-2020

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07/10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Marco Jurídico		HOJA: 7 DE: 24

Ley Aduanera.

D.O.F. 15-XII-1995 y sus reformas

Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

D.O.F. 18-III-2005 y sus reformas

Ley Federal de Sanidad Animal.

D.O.F. 25-VII-2007 y sus reformas

Ley General de Responsabilidades Administrativas.

D.O.F. 18-VII-2016 y sus reformas

Ley Federal de Procedimiento Administrativo.

D.O.F. 04-VIII-1994 y sus reformas

Ley Federal de Procedimiento Contencioso Administrativo.

D.O.F. 01-XII-2005 y sus reformas

Ley Federal de Presupuesto y Responsabilidad Hacendaria.

D.O.F. 30-III-2006 y sus reformas

Ley Federal de Responsabilidad Patrimonial del Estado.

D.O.F. 31-XII-2004 y sus reformas

Ley del Impuesto al Valor Agregado.

D.O.F. 29-XII-1978 y sus reformas

Ley del Impuesto sobre la Renta.

D.O.F. 11-XII-2013 y sus reformas

Ley de Fiscalización y Rendición de Cuentas de la Federación.

D.O.F. 18-VII-2016 y sus reformas

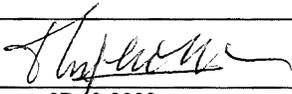
Presupuesto de Egresos de la Federación para el Ejercicio Fiscal 2022.

D.O.F. 29-XI-2021

CÓDIGOS

Código Penal Federal.

D.O.F. 14-VIII-1931 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Marco Jurídico		HOJA: 8 DE: 24

Código Nacional de Procedimientos Penales.
D.O.F. 05-III-2014 y sus reformas

Código Civil Federal.
D.O.F. 26-V-1928 y sus reformas

Código Federal de Procedimientos Civiles.
D.O.F. 24-II-1943 sentencia de la SCJN 18-II-2022

Código de Ética de la Administración Pública Federal.
D.O.F. 08-II-2022

Código de Ética y de Conducta del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
Fecha de expedición: 30-VI-2020

REGLAMENTOS

Reglamento de la Ley Federal de las Entidades Paraestatales.
D.O.F. 26-I-1990 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Archivos.
D.O.F. 13-V-2014

Reglamento de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental.
D.O.F. 11-VI-2003

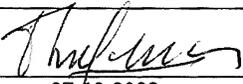
Reglamento de la Ley General para la Inclusión de las Personas con Discapacidad.
D.O.F. 30-XI-2012

Reglamento de la Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.
D.O.F. 28-VII-2010 y sus reformas

Reglamento de la Ley General para el Control del Tabaco.
D.O.F. 31-V-2009 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Protección Civil.
D.O.F. 13-V-2014 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Prestación de Servicios de Atención Médica.
D.O.F. 14-V-1986 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Marco Jurídico		HOJA: 9 DE: 24

Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud.
D.O.F. 06-I-1987 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos.
D.O.F. 20-II-1985 y sus reformas

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.
D.O.F. 18-I-1988 y sus reformas

Reglamento de Insumos para la Salud.
D.O.F. 04-II-1998 y sus reformas

Reglamento de la Ley Aduanera.
D.O.F. 20-IV-2015 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal.
D.O.F. 21-V-2012

Reglamento de la Ley Federal Sobre Metrología y Normalización.
D.O.F. 14-I-1999 y sus reformas

Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.
D.O.F. 23-XI-1994 y sus reformas

Reglamento de la Ley Federal del Derecho de Autor.
D.O.F. 22-V-1998 y sus reformas

ACUERDOS

Acuerdo por el que se restringen áreas para consumo de tabaco en las unidades médicas de la Secretaría de Salud y en los Institutos Nacionales de Salud.
D.O.F. 17-IV-1990

Acuerdo que establece los lineamientos que deberán observarse en los establecimientos públicos que presten servicios de atención médica para regular su relación con los fabricantes y distribuidores de medicamentos y otros insumos para la salud, derivada de la promoción de productos o la realización de actividades académicas, de investigación o científicas.
D.O.F. 12-VIII-2008

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Marco Jurídico		HOJA: 10 DE: 24

Acuerdo mediante el cual se aprueban los Lineamientos que establecen los procedimientos internos de atención a solicitudes de acceso a la información pública.

D.O.F. 12-II-2016

Acuerdo mediante el cual se aprueban los Lineamientos para la emisión de criterios de interpretación del Instituto Nacional de Transparencia, Acceso a la Información y Protección de Datos Personales.

D.O.F. 03-III-2016

Acuerdo del Consejo Nacional del Sistema Nacional de Transparencia, Acceso a la Información Pública y Protección de Datos Personales, por el que se aprueban los Lineamientos para determinar los catálogos y publicación de información de interés público; y para la emisión y evaluación de políticas de transparencia proactiva.

D.O.F. 15-IV-2016 y sus reformas

Acuerdo del Consejo Nacional del Sistema Nacional de Transparencia, Acceso a la Información Pública y Protección de Datos Personales, por el que se aprueban los Lineamientos para la Organización y Conservación de los Archivos.

D.O.F. 04-V-2016

Acuerdo del Consejo Nacional del Sistema Nacional de Transparencia, Acceso a la Información Pública y Protección de Datos Personales, por el que se emiten los Criterios para que los Sujetos Obligados Garanticen Condiciones de Accesibilidad que Permitan el Ejercicio de los Derechos Humanos de Acceso a la Información y Protección de Datos Personales a Grupos Vulnerables.

D.O.F. 04-V-2016

Acuerdo del Consejo Nacional del Sistema Nacional de Transparencia, Acceso a la Información Pública y Protección de Datos Personales, por el que se aprueban los lineamientos que deberán observar los sujetos obligados para la atención de requerimientos, observaciones, recomendaciones y criterios que emita el Sistema Nacional de Transparencia, Acceso a la Información Pública y Protección de Datos Personales.

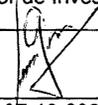
D.O.F. 04-V-2016

Acuerdo del Consejo Nacional del Sistema Nacional de Transparencia, Acceso a la Información Pública y Protección de Datos Personales, por el que se aprueban los Lineamientos técnicos generales para la publicación, homologación y estandarización de la información de las obligaciones establecidas en el título quinto y en la fracción IV del artículo 31 de la Ley General de Transparencia y Acceso a la Información Pública, que deben de difundir los sujetos obligados en los portales de Internet y en la Plataforma Nacional de Transparencia.

D.O.F. 04-V-2016 y sus reformas

Acuerdo por el que se establecen las bases generales para la rendición de cuentas de la Administración Pública Federal y para realizar la entrega-recepción de los asuntos a cargo de los servidores públicos y de los recursos que tengan asignados al momento de separarse de su empleo, cargo o comisión.

D.O.F. 06-VII-2017 y sus reformas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Marco Jurídico		HOJA: 11 DE: 24

Acuerdo por el que se declara la obligación de la implementación, para todos los integrantes del Sistema Nacional de Salud, del documento denominado Acciones Esenciales para la Seguridad del Paciente.
D.O.F. 08-IX-2017

Acuerdo mediante el cual se aprueban los Instrumentos Técnicos que refiere el Título Décimo de los Lineamientos Generales de Protección de Datos Personales para el Sector Público, en materia de evaluación del desempeño de los sujetos obligados del sector público federal en el cumplimiento a la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados.
D.O.F. 26-XI-2021

Acuerdo por el que se emiten los Lineamientos Generales para la integración y funcionamiento de los Comités de Ética.
D.O.F. 28-XII-2020

Acuerdo por el que se emite la Política de Transparencia, Gobierno Abierto y Datos Abiertos de la Administración Pública Federal 2021-2024.
D.O.F. 30-VI-2021

Acuerdo por el que se emiten las Reglas de Operación del Programa Fortalecimiento a la Atención Médica, para el ejercicio fiscal 2022.
D.O.F. 29-XII-2021

Acuerdo por el que se emiten los criterios y especificaciones técnicos para la accesibilidad de las personas con discapacidad a los inmuebles de la Administración Pública Federal.
D.O.F. 10-I-2022

NORMAS OFICIALES MEXICANAS

Norma Oficial Mexicana NOM-064-SSA1-1993, que Establece las Especificaciones Sanitarias de los Equipos de Reactivos Utilizados para el Diagnóstico.
D.O.F. 24-II-1995

Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.
D.O.F. 02-II-1999

Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológicos – infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo.
D.O.F. 17-II-2003

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Marco Jurídico		HOJA: 12 DE: 24

Norma Oficial Mexicana NOM-026-STPS-2008, Colores y señales de seguridad e higiene, e identificación de riesgos por fluidos conducidos en tuberías.

D.O.F. 25-XI-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-137-SSA1-2008, Etiquetado de Dispositivos Médicos.

D.O.F. 12-XII-2008

Norma Oficial Mexicana NOM-030-STPS-2009, Servicios preventivos de seguridad y salud en el trabajo-funciones y actividades.

D.O.F. 22-XII-2009

Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEGOB-2011, Señales y Avisos para Protección Civil, Colores, Formas y Símbolos a Utilizar.

D.O.F. 23-XII-2011

Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y Funcionamiento de los Laboratorios Clínicos.

D.O.F. 27-III-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-047-SSA1-2011, Salud ambiental-Índices biológicos de exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas.

D.O.F. 06-VI-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA3-2012, Educación en salud. Para la organización y funcionamiento de residencias médicas.

D.O.F. 04-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012. Del Expediente Clínico.

D.O.F. 15-X-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012. Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos.

D.O.F. 04-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA3-2012, Para la atención integral a personas con discapacidad.

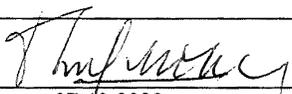
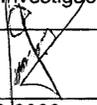
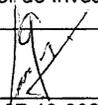
D.O.F. 14-IX-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA3-2012, que Establece las Características Mínimas de Infraestructura y Equipamiento de Hospitales y Consultorios de Atención Médica Especializada.

D.O.F. 08-I-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-024-SSA3-2012, Sistemas de información de registro electrónico para la salud. Intercambio de información en salud.

D.O.F. 30-XI-2012

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Marco Jurídico		HOJA: 13 DE: 24

Norma Oficial Mexicana NOM-028-STPS-2012, Sistema para la administración del trabajo-Seguridad en los procesos y equipos críticos que manejen sustancias químicas peligrosas.
D.O.F. 06-IX-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA3-2012, En materia de información en salud.
D.O.F. 30-XI-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2012, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, faboterápicos (sueros) e inmunoglobulinas en el humano.
D.O.F. 28-IX-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.
D.O.F. 26-X-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA3-2013, que Establece las Características Arquitectónicas para Facilitar el Acceso, Tránsito, Uso y Permanencia de las Personas con Discapacidad en Establecimientos para la Atención Médica Ambulatoria y Hospitalaria del Sistema Nacional de Salud.
D.O.F. 12-IX-2013

Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2016, Instalación y Operación de la Farmacovigilancia.
D.O.F. 19-VII-2017 y sus reformas

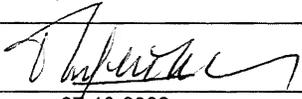
Norma Oficial Mexicana NOM-005-SSA3-2018, que Establece los Requisitos Mínimos de Infraestructura y Equipamiento de Establecimientos para la Atención De Pacientes Ambulatorios.
D.O.F. 09-VII-2020

PLANES Y PROGRAMAS

Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024.
D.O.F. 12-VII-2019

Programa Sectorial de Salud 2020-2024.
D.O.F. 17-VIII-2020

Programa Institucional 2020-2024 del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (PIINCMNSZ).
D.O.F. 27-XI-2020 nota aclaratoria 28-I-2021

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Marco Jurídico		HOJA: 14 DE: 24

DOCUMENTOS NORMATIVOS-ADMINISTRATIVOS

Guía Interna para la Elaboración de Manuales Administrativos y/o Documentos Normativos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

D.O.F. 07-V-2019

Estatuto Orgánico del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

D.O.F. 06-III-2020 nota aclaratoria 03-III-2021

Manual de Organización Específico del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Fecha de autorización: 03-X-2016

Declaratoria de igualdad laboral y no discriminación en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Fecha de expedición: 25-V-2020

Pronunciamiento de Cero Tolerancia al Hostigamiento Sexual y Acoso Sexual en el ámbito laboral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Fecha de expedición: 25-V-2020

Aviso por el que se dan a conocer las Reglas de Propiedad Intelectual del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

D.O.F. 04-I-2017

Aviso por el que se dan a conocer las Políticas de Transferencia de Tecnología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

D.O.F. 04-I-2017

OTRAS DISPOSICIONES

Guía Técnica para la Elaboración y Actualización de Manuales de Procedimientos de la Secretaría de Salud.

Fecha de expedición: IX-2013

Manual de Organización y Operación del Sistema Nacional de Protección Civil.

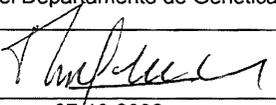
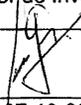
D.O.F. 13-VII-2018

Manual de Identidad Gráfica 2018-2024.

Última actualización: 30-I-2020

Guía para identificar y prevenir conductas que puedan constituir conflicto de interés de los servidores públicos.

Fecha de publicación: I-2017

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07/10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Marco Jurídico		HOJA: 15 DE: 24

Protocolo para la prevención, atención y sanción del hostigamiento sexual y acoso sexual.
D.O.F. 03-I-2020 nota aclaratoria 07-IV-2020

Protocolo de Actuación de los Comités de Ética y de Prevención de Conflictos de Interés en la Atención de Presuntos Actos de Discriminación.
D.O.F. 18-VII-2017

Prontuario para el uso del Lenguaje Incluyente y no sexista en la Función Pública.
Fecha de autorización: I-2020

Estándares para Implementar el Modelo en Hospitales, Modelo de Seguridad del Paciente; Consejo General de Salubridad.
Fecha de autorización: 10-X-2018

LINEAMIENTOS

Lineamientos Generales para la Organización y Conservación de los Archivos del Poder Ejecutivo Federal.
D.O.F. 03-VII-2015

Lineamientos por los que se establecen medidas de austeridad en el gasto de operación en las dependencias y entidades de la Administración Pública Federal.
D.O.F. 22-II-2016

Lineamientos Para Analizar Valorar y Decidir el Destino Final de Documentación de las Dependencias y Entidades del Poder Ejecutivo Federal.
D.O.F. 16-III-2016

Lineamientos Generales de Protección de Datos Personales para el Sector Público.
D.O.F. 26-I-2018 adición 25-XI-2020

Lineamientos en materia de Austeridad Republicana de la Administración Pública Federal.
D.O.F. 18-IX-2020

Lineamientos de Racionalidad y Austeridad Presupuestaria 2021.
D.O.F. 26-II-2021

Lineamientos para la Administración de Recursos de Terceros destinados a financiar proyectos de investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
Fecha de publicación: X-2016

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Lineamientos de trabajo del Laboratorio de Genética en las Áreas de Citogenética y Biología Molecular		HOJA: 16 DE: 24

II. LINEAMIENTOS DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE GENÉTICA EN LAS ÁREAS DE CITOGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

1. El Laboratorio de Genética realiza la recepción o toma de muestras de estudios de Citogenética o Biología Molecular en un horario de lunes a viernes de 8:00 a 13:00 horas.
2. Las servidoras y los servidores públicos operativos de las áreas de Citogenética y Biología Molecular son responsables de cumplir con las Acciones Esenciales de Seguridad del Paciente durante las fases preanalítica, analítica y postanalítica de los estudios de laboratorio solicitados por la persona beneficiaria.
3. La Jefa del Laboratorio es responsable de adquirir anualmente por licitación los insumos necesarios para la realización de estudios de rutina de tipo asistencial del área de Citogenética y Biología Molecular.
4. La Jefa de Laboratorio es responsable de recibir de las áreas usuarias la lista de insumos necesarios de los estudios asistenciales en formato físico y electrónico para su captura en el Programa Anual de Adquisiciones.
5. Las servidoras y los servidores públicos operativos de las áreas de Citogenética y Biología Molecular son responsables de recibir los productos, de verificar que cumplan con las especificaciones técnicas, fechas de caducidad requeridas en el Programa Anual de Adquisiciones para ser utilizados en los diferentes procedimientos de laboratorio y de firmar la salida correspondiente del almacén.
6. Las servidoras y los servidores públicos operativos de las áreas de Citogenética y Biología Molecular son responsables de mantener actualizado el registro de inventarios y/o existencias y periodo de vencimiento de reactivos en la bitácora de registro de insumos del área respectiva.
7. La Jefa de Laboratorio es responsable de mantener actualizado el inventario de reactivos en la bitácora general de registro de insumos a fin de contar con un control de los pedidos, entregas de productos o realizar las gestiones necesarias para tramitar la compra de reactivos y dar continuidad a los estudios asistenciales del Departamento.
8. Las servidoras y los servidores públicos operativos de las áreas de Citogenética y Biología Molecular son responsables de verificar que se realice el mantenimiento preventivo de los equipos de laboratorio y de reportar las fallas de los mismos a la Jefa de Laboratorio y al Departamento de Ingeniería Biomédica a fin de recibir el mantenimiento correctivo correspondiente.
9. Las servidoras y los servidores públicos operativos son responsables de realizar los estudios de Citogenética y Biología Molecular en estricto apego a los procedimientos descritos en este Manual de Procedimientos Técnicos del Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Lineamientos de trabajo del Laboratorio de Genética en las Áreas de Citogenética y Biología Molecular		HOJA: 17 DE: 24

10. La Jefa de Laboratorio es responsable de realizar reuniones de trabajo (documentadas en la minuta correspondiente) con las servidoras o servidores público operativos de las áreas de Citogenética y Biología Molecular para dar seguimiento al cumplimiento de las actividades y responsabilidades asignadas de acuerdo a las políticas de trabajo establecidas previamente.
11. La Jefa de Laboratorio es responsable de firmar los informes de Resultados de los Estudios Asistenciales de Rutina para su autorización y liberación. En caso de ausencia de la Jefa del Laboratorio, el Jefe del Departamento de Genética es responsable de firmar dichos informes.
12. La Jefa de Laboratorio es responsable de apoyar en la realización de los estudios en el área de su competencia.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Recomendaciones Ante la Pandemia de COVID-19		HOJA: 18 DE: 24

III.RECOMENDACIONES ANTE LA PANDEMIA DE COVID-19

GUÍA PARA EL MANEJO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA EN LAS ÁREAS DE CITOGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Los coronavirus se identificaron por primera vez en 1960, causan distintas enfermedades respiratorias, entre ellas el resfriado común. La enfermedad COVID-19 es causada por el ARN virus SARS-CoV-2, se transmite de persona a persona por diferentes vías principalmente el contacto y la inhalación de gotas y aerosoles respiratorios emitidos por un enfermo o fómites contaminados con secreciones de mucosa bucal, nariz, ojos e incluso saliva. Esta enfermedad puede ser letal dependiendo de la susceptibilidad individual a la infección por el virus.

A la fecha se tiene información limitada sobre la detección de SARS-CoV-2 en otros fluidos corporales de los ya mencionados previamente. En muestras de sangre periférica y suero de personas beneficiarias se ha detectado RNA viral (41% y 1% respectivamente) mediante técnicas moleculares, sin tener certeza de su viabilidad y capacidad infecciosa; en muestras de médula ósea se desconoce la capacidad replicativa del virus en cultivos in vitro.

De acuerdo a las guías internacionales y recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) relacionadas al virus SARS-CoV-2, los laboratorios toman medidas apropiadas en el manejo de muestras biológicas como la sangre periférica (SP) o la médula ósea (MO) de personas beneficiarias con COVID-19 positivos o con alta sospecha destinadas a estudios moleculares o citogenéticos de rutina.

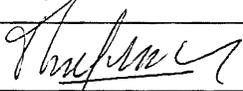
OBJETIVO

Establecer lineamientos para la recepción, procesamiento y desecho de muestras de SP, MO y otros materiales biológicos de personas beneficiarias confirmadas y/o sospechosas de COVID-19 en las áreas de Citogenética y Biología Molecular del Laboratorio de Genética del Instituto.

CONSIDERACIONES GENERALES

Las muestras de las personas beneficiarias con infección confirmada o con sospechosa de COVID-19 se procesarán de forma individual con el propósito de que se tenga control desde su recepción hasta el reporte de resultados.

Las servidoras o los servidores públicos que manipule las muestras destinadas a estudios citogenéticos o de biología molecular son responsable de utilizar en todo el proceso el equipo de protección individual (bata, doble guante, mascarilla, gafas).

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Recomendaciones Ante la Pandemia de COVID-19		HOJA: 19 DE: 24

1. RECEPCIÓN Y REGISTRO DE MUESTRAS.

Las servidoras o los servidores públicos operativos son responsables de:

1. Recibir las muestras en las áreas de Citogenética y/o Biología Molecular del Laboratorio de Genética portando el equipo de protección personal.
2. Depositar las muestras y solicitudes de estudios en los contenedores destinados para tal efecto en el área correspondiente.
3. Revisar que las muestras estén rotuladas con el nombre de la persona beneficiaria y la confirmación o sospecha de infección por COVID-19, estos tienen que coincidir con los datos registrados en la solicitud de estudio correspondiente. No será recibida muestra que no cumpla con las indicaciones mencionadas previamente.
4. Manipular con guantes todas las muestras y documentos "físicos" asociados (solicitudes de estudios, recibos de pago, hoja de referencia, etc.).
5. Registrar las muestras en las bitácoras correspondientes, así como el registro de la servidora o el servidor público que se encuentra implicado en el proceso.

2. DESINFECCIÓN

Las servidoras o los servidores públicos operativos son responsables de:

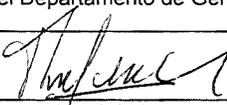
Descontaminar las superficies, los contenedores primarios y secundarios utilizando alguna de las siguientes soluciones:

1. Solución de hipoclorito sódico al 0.1% para superficies, dejar un tiempo de contacto de mínimo 1 minuto.
2. Solución de etanol al 70%.

3. INACTIVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las servidoras o los servidores públicos operativos son responsables de:

Colocar en un contenedor de la Cámara de Seguridad Biológica (CSB) o Campana de Flujo Laminar (CFL) los sobrenadantes y el material de laboratorio que entra en contacto con la muestra (puntas, pipeta Pasteur, tubos) para la inactivación del virus con la siguiente solución:

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Recomendaciones Ante la Pandemia de COVID-19		HOJA: 20 DE: 24

1. Solución de hipoclorito sódico 10% para material en contacto con la muestra.

Verificar que el material esté completamente en contacto con la solución desinfectante al menos 15 minutos para la inactivación del virus.

NOTA: La CFL sólo protege la muestra que se manipula, pero no la seguridad de las servidoras o los servidores operativos por lo que es obligatorio utilizar el equipo de seguridad personal.

4. UTILIZACIÓN DE CSB O CFL

Las servidoras o los servidores públicos operativos son responsables de:

Realizar dentro de una CSB clase II o CFL procedimientos generadores de aerosoles como los descritos a continuación:

1. Centrifugación, trituración, homogeneización, agitación o mezcla vigorosa.
2. Inoculación de frascos de cultivo celular.
3. Sanitizar la CSB con solución de hipoclorito sódico al 0.1%, peróxido de hidrogeno al 5% o alcohol al 70%.
4. Descontaminar con alcohol al 70% la superficie de los materiales que se coloquen dentro de la CSB.

5. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

5.1 PROCEDIMIENTOS DE CITOGÉNÉTICA

5.1.1 Muestras de Médula ósea (MO) y Sangre Periférica (SP)

- a) Durante el proceso del cultivo de muestras la generación de aerosoles es constante (pipeteo, vortex, etc.) por lo que es recomendable el procesamiento de dichas muestras en CSB clase II CFL.
- b) En el caso de no disponer de centrifuga dentro de la CSB o CFL, se cierran todos los tubos antes de retirarlos de la misma. Una vez cerrados, se procede a su centrifugación con normalidad.
- c) Trabajar con material de plástico y con tapón de rosca en sustitución de material de vidrio si es posible.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Recomendaciones Ante la Pandemia de COVID-19		HOJA: 21 DE: 24

- d) Descontaminar con etanol 70% todo lo que se va a introducir y antes de retirar el material de la CSB o CFL

5.1.2 Siembra

- a) Utilizar frascos de cultivo con tapón de rosca.
b) Desechar las puntas de pipeta en un recipiente con solución desinfectante.

5.1.3 Cosecha

- a) En caso de no disponer de centrifuga dentro de la CSB o CFL, evitar destapar los tubos inmediatamente, se deja reposar la muestra para evitar formación de aerosoles al abrir los tubos.
b) La incorporación de la colchicina, así como el choque hipotónico se realiza en la CSB o CFL por la generación de aerosoles durante el procedimiento.

5.1.4 Bando

- a) Todo el procesamiento posterior a la fijación de la muestra en ácido acético-metanol (Carnoy) no requiere el uso de CSB o CFL.

5.2 TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDAS FLUORESCENTE (FISH)

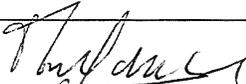
La técnica de FISH a partir del material fijado en Carnoy procedente del cultivo de citogenética se realiza sin necesidad de CSB o CFL.

En caso de realizar la técnica de FISH a partir de una muestra fresca (sin realizar cultivo previo), todo el procesamiento previo a la fijación de la muestra se realiza en la CSB clase II o CFL.

5.3 PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

5.3.1 Muestras de SP Sangre periférica y Mucosa Oral

- a) Durante el procesamiento de muestras la generación de aerosoles es constante (pipeteo, vortex, etc.) por lo que se trabaja en CSB clase II o CFL hasta la etapa de inactivación.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Recomendaciones Ante la Pandemia de COVID-19		HOJA: 22 DE: 24

- b) Las muestras para amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) pueden también inactivarse mediante tratamiento de calor a 60 °C durante 60 minutos. Sin embargo, para incrementar la bioseguridad, se recomienda utilizar una solución desnaturalizante combinada con la inactivación por calor en caso de ser necesario.

6. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (AN)

En general, la etapa de lisis inactiva cualquier virus, posterior a esta etapa la muestra se considera generalmente como no infecciosa conservando la integridad de los AN. Los tampones de lisis que contienen guanidina y que se utiliza para la extracción de AN constituyen uno de los métodos mejor probados para inactivar virus.

Método Manual: Se realiza en la CSB o CFL hasta la etapa de lisis celular.

Método Automatizado: Se realiza todo el proceso dentro del equipo de extracción y se procede a desinfectarlo al término de éste.

7. AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y SECUENCIACIÓN

Realiza en CSB tipo II o CFL las pruebas de diagnóstico molecular no propagativo como la secuenciación, prueba de amplificación de ácido nucleico por PCR de punto final o en Tiempo Real.

8. ALMACENAMIENTO A CORTO Y LARGO PLAZO

Las muestras de interés diagnóstico que no representan un riesgo biológico son almacenadas de acuerdo a las instrucciones operativas correspondientes.

9. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los residuos líquidos biológicos y/o secreciones, así como los objetos cortantes y/o punzantes, se recogen en los contenedores de plástico rígidos y contenedores específicos para agujas y elementos cortantes respectivamente.

En ningún caso, los residuos líquidos, así como los cortantes y/o punzantes son depositados dentro de las bolsas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Recomendaciones Ante la Pandemia de COVID-19		HOJA: 23 DE: 24

10. FORMATOS, REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA 2020 (in press).

Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature 2020 (in press).

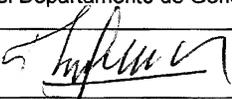
Zheng S, Fan J, Yu F, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study.

Manual de bioseguridad en el laboratorio. – 3a ed. Geneva: Organización Mundial de la Salud; 2004.

Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19) Interim guidance 19 March 2020.

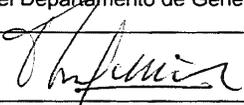
11. GLOSARIO

- 11.1 Cámara de seguridad biológica clase II (CSB):** Equipo que proporciona una barrera de contención para trabajar de forma segura con agentes infecciosos. Los de clase II se caracterizan por brindar protección al personal, al ambiente y al producto.
- 11.2 Campana de flujo laminar (CFL):** Equipo utilizado para eliminación de partículas en el aire, especialmente de posibles contaminantes (bacterias, levaduras, hongos).
- 11.3 Sobrenadantes:** Es el líquido que queda sobre un sedimento o precipitado, después de producida la sedimentación.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

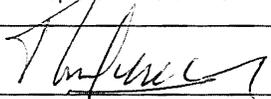
SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small> 	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Instrucciones Operativas		HOJA: 24 DE: 24

IV. INSTRUCCIONES OPERATIVAS

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small> 	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 1 DE: 14

1. INSTRUCCIÓN OPERATIVA PARA LA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 2 DE: 14

TOMA DE MUESTRAS DE BIOLÓGICAS	
Clave: IO-GEN-01	Versión: 0

	Nombre	Cargo	Firma	Fecha
Elaboró	Q.F.B. MARÍA A. LÓPEZ HERNÁNDEZ	JEFA DE LABORATORIO		07-10-2022
Revisó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022
Aprobó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022

Revisión Bi-Anual		
<i>La firma indica que el procedimiento se mantiene SIN modificaciones</i>		
Nombre	Firma	Fecha

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 3 DE: 14

1.0 RESPONSABILIDADES

La Jefa de Laboratorio, la Química y/o el Químico Investigador cumplen con lo descrito en este procedimiento en apego a las Acciones Esenciales de Seguridad del Paciente.

2.0 PRINCIPIO

Reacción

La toma de muestras constituye la fase preanalítica dentro de un proceso e influye directamente en la calidad y trazabilidad de resultados.

Aplicación clínica

El material biológico obtenido permite la implementación y realización de diversas técnicas citogenéticas y de biología molecular con fines diagnóstico, pronóstico o terapéuticos, los procedimientos a los que se expone dicho material desde su obtención hasta su fase analítica, pueden tener un efecto directo en los resultados.

3.0 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

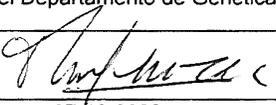
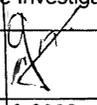
REQUISITOS PARA REALIZAR LA TOMA DE MUESTRA:

1. Solicitud de estudio con los datos completos de la persona beneficiaria del Instituto: nombre completo, fecha de nacimiento, número de registro, nombre de la Médica o Médico tratante y estudio requerido.
2. Cuando una persona beneficiaria provenga de otra institución de salud solicita la hoja de referencia con breve resumen clínico y la autorización (firma y sello) correspondiente.
3. Cuando las personas beneficiarias provengan de instituciones de salud que tengan convenio con el Instituto verifican que los documentos tengan el sello de la Coordinación de Servicios Subrogados.
4. Solicitud de estudio correspondiente y recibo de pago sellado por la caja de cobro.

3.1 PREPARACIÓN DE LA PERSONA BENEFICIARIA

No se requiere ayuno.

3.2 TIPO DE MUESTRA

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 4 DE: 14

3.2.1 Estudios de Cariotipo e Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes (FISH) en Sangre Periférica:

Sangre periférica obtenida por punción venosa.

3.2.2 Estudios de Biología Molecular:

Sangre periférica obtenida por punción venosa (véase en figura 1).

Mucosa oral obtenida por raspado de la pared interna de las mejillas (véase figura 2).

3.3 CONDICIONES DE LA MUESTRA

Estudios de Cariotipo e Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes (FISH) en Sangre Periférica:

Sangre periférica	Volumen	
	Óptimo	Mínimo
	10 ml	5ml

NOTA: cuando se trate de personas beneficiarias pediátricas el volumen de la muestra puede ser menor de 5 ml.

Estudios de Biología Molecular:

TIPO DE MUESTRA	VOLUMEN	
	Óptimo	Minimo
Sangre total	5.0 ml	2.0 ml

Mucosa oral: se utiliza el material total obtenido del raspado de la pared interna de las mejillas.

3.3.1 Recipiente de recolección:

3.3.1.1 Estudios de Cariotipo e Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes (FISH) en Sangre Periférica:

La muestra recolectada en jeringa con solución de heparina 200 U/ml.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 5 DE: 14

3.3.1.2 Estudios de Biología Molecular:

Sangre total: recolectarse en tubo de tapón morado con EDTA como anticoagulante.

Mucosa oral: Tubo eppendorf de 1.5 ml con solución de PBS.

3.3.2 Identificación de la muestra:

Véase la **Política 3**, las actividades 14 y 17 del Procedimiento para Realizar Estudios Especializados de Citogenética y Biología Molecular del **Manual de Procedimientos del Departamento de Genética**.

3.3.3 Factores de rechazo:

Incumplimiento de los requisitos mencionados en los puntos 3.2 y 3.3.

3.4 CONDICIONES DE MANEJO Y ALMACENAMIENTO

3.4.1 Estudios de Cariotipo e Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes (FISH) en Sangre Periférica:

Las muestras se conservan a temperatura ambiente hasta que inicia el procesamiento de las mismas y son manipuladas sólo por la servidora y/o el servidor público autorizado del área de Citogenética.

3.4.2 Estudios de Biología Molecular:

La muestra esta contenida en tubos cerrados a temperatura ambiente. Se recomienda procesar la muestra las primeras 24 horas después de realizada la toma. La muestra es manipulada sólo por la servidora y/o el servidor público autorizado del área de Biología Molecular.

4.0 REACTIVOS

- Etanol.
- Heparina 200 U/ul.
- Agua inyectable.
- Cloruro de potasio.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 6 DE: 14

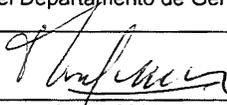
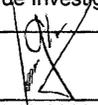
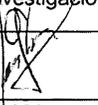
- Cloruro de sodio.
- Fosfato de sodio.
- Fosfato de potasio.
- Agua destilada.

4.1 MATERIALES

- Jeringas 10 ml.
- Ligadura.
- Torundas con etanol.
- Tubos tapón morado con EDTA.
- Tubos cónicos 50 ml.
- Tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Marcador indeleble.
- Tela adhesiva.
- Tela micropore.
- Banditas adhesivas.
- Cepillos para toma de mucosa oral.
- Agua inyectable estéril.
- Heparina.
- Colector de residuos biológico infecciosos.

4.2 PREPARACIÓN

PBS 10X

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 7 DE: 14

- a) Disolver 8.0 gms de cloruro de sodio, 0,2 gramos de cloruro de potasio, 2.68 gms fosfato de sodio, 0.24 de fosfato de potasio en 80 ml de agua destilada.
- b) Ajustar pH a 7.4 con ácido clorhídrico.
- c) Aforar a 100 ml con agua destilada y esterilizar por filtración.
- d) Almacenar a temperatura ambiente.

PBS 1X

- a) Diluir 10 ml de PBS 10 x en 90 ml de agua.

4.3 ACEPTABILIDAD

- a) Solución de heparina con fecha de caducidad vigente.
- b) Tubos con EDTA tapón morado con fecha de caducidad vigente.

4.4 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- a) Solución de heparina almacenada a 4 °C.
- b) Solución de enjuague bucal se prepara al momento de la toma de muestra de mucosa oral.

5.0 CALIBRACIÓN

5.1 IDENTIFICACIÓN DEL CALIBRADOR

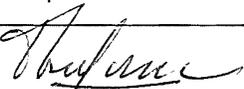
No Aplica.

5.2 PREPARACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.3 PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 8 DE: 14

5.4 ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y FRECUENCIA DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

6.0 CONTROL DE CALIDAD

6.1 IDENTIFICACIÓN DE CONTROLES

No Aplica.

6.2 PREPARACIÓN DEL CONTROL

No Aplica.

6.3 FRECUENCIA DE USO DE CONTROLES

No Aplica.

6.4 ALMACENAMIENTO

No Aplica.

6.5 PROCEDIMIENTO DEL USO DE LOS CONTROLES

No Aplica.

6.6 LÍMITES DE ACEPTABILIDAD Y ACCIONES CORRECTIVAS

No Aplica.

6.7 REGISTRO Y ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS DE CONTROL DE CALIDAD

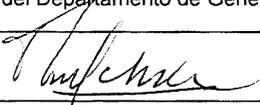
No Aplica.

6.8 EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD

No Aplica.

6.9 ALTERNATIVAS EN AUSENCIA DE CONTROLES

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 9 DE: 14

7.0 EQUIPO NECESARIO

- Torundas.
- Jeringas 10 ml.
- Ligadura.
- Tubos tapón morado con EDTA.
- Tubos cónicos 50 ml.
- Tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Marcador indeleble.
- Tela adhesiva.
- Tela micropore.
- Banditas adhesivas.
- Cepillos para toma de mucosa oral.
- Colector de residuos biológico infecciosos.

8.0 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

SANGRE VENOSA PARA ESTUDIOS CITOGENÉTICOS:

Las Químicas y los Químicos del Área de Citogenética son los responsables de:

1. Verificar que la persona beneficiaria esté cómodamente sentada.
2. Localizar una vena en la cara anterior del codo y colocar el torniquete en la parte media del brazo.
3. Desinfectar el área con un algodón humedecido con alcohol al 70 %.
4. Preparar jeringa bañada con solución anticoagulante de heparina a una concentración final de 200 U/ml.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

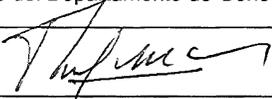
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 10 DE: 14

5. Introducir la aguja con el bisel hacia arriba, jalar el émbolo y aspirar con suavidad.
6. Retirar el torniquete al empezar a fluir la sangre, y una vez que se obtenga la cantidad de sangre requerida y extrae la aguja.
7. Tapar la jeringa cuidadosamente y homogenizar la muestra.
8. Colocar una torunda con alcohol sobre el sitio de punción ejerciendo presión para detener la hemorragia.
9. Identificar la muestra con los datos de la persona beneficiaria.
10. Registrar muestra en la bitácora correspondiente.

SANGRE VENOSA PARA ESTUDIOS MOLECULARES:

La Jefa de Laboratorio y la Química o el Químico Investigador son responsables de:

1. Verificar que la persona beneficiaria esté cómodamente sentada.
2. Localizar una vena en la cara anterior del codo y colocar el torniquete en la parte media del brazo.
3. Desinfectar el área con un algodón humedecido con alcohol al 70 %.
4. Introducir la aguja con el bisel hacia arriba, jalar el émbolo y aspirar con suavidad.
5. Retirar el torniquete al empezar a fluir la sangre, una vez que se obtenga la cantidad de sangre requerida extrae la aguja.
6. Colocar una torunda con alcohol sobre el sitio de punción ejerciendo presión para detener la hemorragia.
7. Verter la sangre a un tubo con tapón morado estéril con anticoagulante EDTA dejándola resbalar lentamente por la pared para evitar hemólisis.
8. Identificar la muestra con los datos de la persona beneficiaria.
9. Registrar muestra en la bitácora correspondiente.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 11 DE: 14

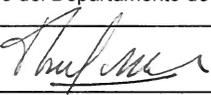


Figura 1. Toma muestra de sangre venosa

MUCOSA ORAL:

La Jefa de Laboratorio y la Química o el Químico Investigador son responsables de:

1. Abrir el empaque y extraer el cepillo tomándolo por el extremo del cuerpo sin tocar el cepillo con los dedos.
2. Introducir el cepillo en la boca y frotar vigorosamente la parte interna de una de las mejillas durante al menos 1 minuto presionando con firmeza.
3. Enjuagar el cepillo en 1 ml de PBS 1X contenido un tubo eppendorf de 1.5 ml.
4. Frotar vigorosamente la parte interna de la otra mejilla durante 1 minuto presionando con firmeza.
5. Enjuagar nuevamente el cepillo en el tubo eppendorf que contiene el primer lavado de las células de mucosa oral.
6. Desechar el cepillo en el contenedor de residuos biológicos.
7. Identificar la muestra con los datos de la persona beneficiaria.
8. Registrar muestra en la bitácora correspondiente.
9. Centrifugar y eliminar sobrenadante.
10. Adicionar 200 ul de PBS 1X y homogenizar.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 12 DE: 14

11. Mantener a -20°C hasta que se realice la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN).



Figura 2. Toma de muestra de mucosa oral

9.0 RESULTADOS

9.1 CÁLCULOS Y CONVERSIONES

No Aplica.

9.2 UNIDADES Y REDONDEO DE NÚMEROS

No Aplica.

9.3 REPORTE DE RESULTADOS

No Aplica.

9.4 INTERVALOS DE REFERENCIA

No Aplica.

9.5 LINEALIDAD E INTERVALO REPORTABLE

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 13 DE: 14

9.6 CRITERIOS DE REPETICIÓN

Incumplimiento de los puntos 3.1 al 3.3.

9.7 VALORES CRÍTICOS

No Aplica.

10.0 INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES DEL MÉTODO

No Aplica.

11.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 16.1 Fase analítica:** Incluye la ejecución de procedimientos analíticos establecidos, obtención, análisis y registro de resultados.
- 16.2 Fase preanalítica:** Incluye todos los pasos desde que se solicita un estudio de laboratorio hasta que la muestra ingresa al laboratorio para ser analizada (recolección de la muestra, recepción en el laboratorio, registro y procesamiento).
- 16.3 Muestra biológica:** Se define como una parte anatómica o fracción de órganos o tejido, excreciones o secreciones obtenidas de un ser humano para su análisis.

12.0 FORMATOS, REFERENCIAS Y BIBLIOGRÁFICA

Directrices de la OMS sobre la extracción de sangre: las mejores prácticas en la flebotomía (WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy. Organización Mundial de la Salud, 2010.

Lavery I, Ingram P. Blood sampling: best practice. Nursing Standard, 2005, 19:55–65.

Sacar S et al. Poor hospital infection control practice in hand hygiene, glove utilization, and usage of tourniquets American Journal of Infection Control, 2006, 34(9):606–609.

Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. A comparison. Acta Cytol 1992 36:706-10.

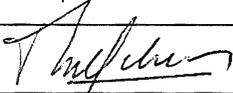
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	1. Instrucción Operativa para la Toma de Muestras Biológicas		HOJA: 14 DE: 14

Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994 77:95-9.

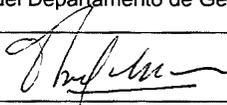
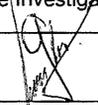
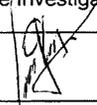
13.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Versión	Fecha	Propósito de la Revisión	Realizado por

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

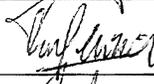
SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small> 	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 1 DE: 14

2. INSTRUCCIÓN OPERATIVA PARA EXTRACCIÓN ÁCIDOS NUCLEICOS

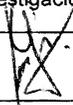
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 2 DE: 14

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	
Clave: IO-GEN-02	Versión: 0

	Nombre	Cargo	Firma	Fecha
Elaboró	Q.F.B. MARÍA A. LÓPEZ HERNÁNDEZ	JEFA DE LABORATORIO		07-10-2022
Revisó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022
Aprobó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022

Revisión Bi-Anual		
<i>La firma indica que el procedimiento se mantiene SIN modificaciones</i>		
Nombre	Firma	Fecha

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 3 DE: 14

1.0 RESPONSABILIDADES

La Jefa de Laboratorio, la Química, el Químico y el Químico Investigador cumplen con lo descrito en este procedimiento en apego a las Acciones Esenciales de Seguridad del Paciente.

2.0 PRINCIPIO

Reacción

La extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) consiste en lisar las células para liberar proteínas y ADN en una fase acuosa.

Las proteínas son removidas de la fase acuosa mediante extracción con solventes orgánicos y el ácido nucleico que permanece en la fase acuosa se precipita con etanol. Posteriormente es purificado, resuspendido en un eluyente adecuado y finalmente se determina la calidad y pureza.

Aplicación clínica

El análisis de ADN es una herramienta que se utiliza de forma rutinaria en diversas metodologías de biología molecular para determinadas enfermedades de origen genético hereditario o enfermedades no hereditarias a las que se asocian alteraciones como factor de riesgo con valor diagnóstico, predictivo y terapéutico.

3.0 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

3.1 PREPARACIÓN DE LA PERSONA BENEFICIARIA

No Aplica.

3.2 TIPO DE MUESTRA

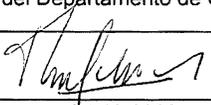
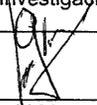
Véase en punto 3.2 de la IO-1 Toma de muestras biológicas.

3.3 CONDICIONES DE LA MUESTRA

Véase en punto 3.3 de la IO-1 Toma de Muestras Biológicas para Estudios de Biología Molecular.

3.3.1 Recipiente de recolección:

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 4 DE: 14

3.3.2 Identificación de la muestra:

Véase en punto 3.3.2 de la IO-1 Toma de muestras biológicas.

3.3.3 Factores de rechazo:

Incumplimiento de los puntos 3.2 y 3.3 de la IO-1 Toma de muestras biológicas.

3.4 CONDICIONES DE MANEJO Y ALMACENAMIENTO

Véase en punto 3.4 de la IO-1 Toma de Muestras Biológicas.

4.0 REACTIVOS

4.1 MATERIALES

EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE TOTAL TÉCNICA MANUAL

- Trizma base.
- Tritón X-100.
- Sacarosa.
- NaCl (Cloruro de sodio).
- HCl (Ácido clorhídrico).
- SDS (Lauril sulfato de sodio).
- Cloroformo.
- Alcohol isoamílico.
- Etanol absoluto.
- Agua destilada.
- Cloro 7 %.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 5 DE: 14

- Agua destilada.

Nota: kit comercial para Extracción de ADN genómico de diferentes muestras biológicas.

4.2 PREPARACIÓN

TTS

- Tris 10mM, pH 7.4.
- Trizma base 0.1211 g.

Nota: ajustar el pH de la solución de Tris adicionando HCl concentrado.

- Tritón X-100 1.0 ml.
- Sacarosa 300 mM 10.269 g.
- Aforar a 100 ml con agua destilada. Esterilizar por filtración y almacenar a 4 °C.

NaCl 5.0 Mm

- Nacl 0.0584 g.
- Aforar con 200 ml de agua destilada. Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

SDS 10 %

- Lauril sulfato de sodio 10.0 g
- Aforar a 100 ml con agua destilada estéril y almacenar a temperatura ambiente.

SEVAG 49:1

- Cloroformo 49.0 ml
- Alcohol isoamílico 1.0 ml
- Homogenizar perfectamente y almacenar en un frasco color ámbar a temperatura ambiente.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 6 DE: 14

Etanol 70%

- a) Etanol absoluto 70.0 ml.
- b) Agua destilada 30.0.
- c) Homogenizar perfectamente y almacenar en un frasco a-20 °C.

Cloro al 0.6% para inactivar sangre

- a) Preparar de acuerdo a la siguiente fórmula:
- b) Partes de agua = [% concentrado original ÷ % de concentración deseada]-1

Sustituyendo:

- a) Partes de agua = [cloro 7%÷0.6% concentración deseada]-1= 10.7 partes de agua se adicionan a 1 parte de cloro al 7%.

Homogenizar y almacenar a temperatura ambiente.

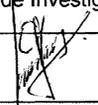
Nota: la muestra biológica se inactiva aproximadamente en 45 minutos.

4.3 ACEPTABILIDAD

- a) Solución de heparina con fecha de caducidad vigente.
- b) Tubos con EDTA tapón morado con fecha de caducidad vigente.

4.4 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- a) **TTS:** Mantener a 4 °C por 6 meses.
- b) **NaCl 5.0 Mm:** Mantener a temperatura ambiente por 6 meses.
- c) **SDS 10 %:** Mantener a temperatura ambiente por 6 meses.
- d) **SEVAG 49:** Almacenar en un frasco color ámbar a temperatura ambiente por tiempo indefinido.
- e) **Etanol 70 %:** Almacenar a-20 °C por tiempo indefinido.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 7 DE: 14

f) **Cloro al 0.6 %:** Almacenar a temperatura ambiente.

5.0 CALIBRACIÓN

5.1 IDENTIFICACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.2 PREPARACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.3 PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

5.4 ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y FRECUENCIA DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

6.0 CONTROL DE CALIDAD

6.1 IDENTIFICACIÓN DE CONTROLES

No Aplica.

6.2 PREPARACIÓN DEL CONTROL

No Aplica.

6.3 FRECUENCIA DE USO DE CONTROLES

No Aplica.

6.4 ALMACENAMIENTO

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 8 DE: 14

6.5 PROCEDIMIENTO DEL USO DE LOS CONTROLES

No Aplica.

6.6 LÍMITES DE ACEPTABILIDAD Y ACCIONES CORRECTIVAS

No Aplica.

6.7 REGISTRO Y ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS DE CONTROL DE CALIDAD

No Aplica.

6.8 EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD

No Aplica.

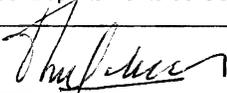
6.9 ALTERNATIVAS EN AUSENCIA DE CONTROLES

Análisis de la calidad mediante:

- a) Electroforesis en gel de agarosa para determinar integridad: una muestra de ADN es íntegra cuando su perfil en una electroforesis de agarosa corresponde a una banda discreta.
- b) Determinar concentración y pureza por análisis de absorbancias 260/280 y 260/230.

7.0 EQUIPO NECESARIO

- Tubos eppendorf de 1.5 ml.
- Micropipetas de volúmenes variables: 100–1000 ul.
20-200 ul.
- Puntas para micropipetas de volumen variable: 100–1000 ul.
20-200 ul.
- Centrífuga.
- Vortex.
- Vaso de precipitado.
- Gradilla.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 9 DE: 14

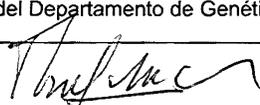
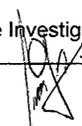
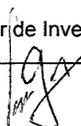
- Balanza analítica.
- Matraz aforado.
- Espectrofotómetro de microvolumen.

8.0 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE TOTAL TÉCNICA MANUAL:

La Jefa del Laboratorio, las Químicas, los Químicos y la Química o Químico Investigador son responsables de:

1. Homogenizar la muestra de sangre contenida en el tubo con EDTA de 5-10 veces por inversión.
2. Medir 1 ml de sangre con ayuda de micropipeta y punta azul.
3. Transferir la muestra lentamente a un tubo eppendorf de 1.5 ml debidamente etiquetada y adicionar 0.6-0.7 ml de TTS.
4. Homogenizar y centrifugar a 14,000 rpm/2 minutos.
5. Decantar el sobrenadante en cloro al 0.6 %.
6. Resuspender el botón en 1 ml de TTS.
7. Centrifugar a 14,000 rpm/2 minutos. Decantar el sobrenadante.
8. Repetir el punto 5 dos veces más para un total de 4 lavados.
9. Resuspender el botón en 0.57 ml de NaCl 5.0 mM.
10. Adicionar 30 µl de SDS al 10%. Homogenizar durante 5 minutos.
11. Adicionar 200 µl de NaCl saturado. Homogenizar perfectamente.
12. Centrifugar a 12,000 rpm/15 minutos.
13. Recuperar el sobrenadante y realizar un lavado con un volumen de SEVAG.
14. Agitar vigorosamente hasta que la solución se torne blanca.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 10 DE: 14

15. Centrifugar a 14,000 rpm/20 minutos.

16. Transferir la fase superior a un frasco de vidrio de 20 ml previamente etiquetado y conteniendo 4 ml de etanol absoluto frío (-20 °C) para precipitar el ADN.

17. Almacenar toda la noche a -20 °C.

18. Tomar con ayuda de la micropipeta y punta amarilla el ADN precipitado y transferirlo a un tubo eppendorf de 0.6 ml debidamente etiquetado.

19. Adicionar 2 volúmenes de etanol al 70% y centrifugar a 14,000 rpm/10 minutos.

20. Repetir un lavado más con etanol al 70%.

21. Decantar el etanol, secar el ADN y resuspender en 100 µl de agua estéril.

22. Almacenar a -20 °C hasta su utilización.

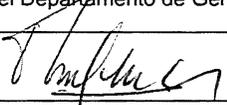
EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE TOTAL CON KIT COMERCIAL:

La Jefa del Laboratorio, las Químicas, los Químicos y la Química o Químico Investigador son responsables de:

1. Realizar el procedimiento de extracción de acuerdo a las especificaciones del fabricante del Kit comercial.
2. Insertar la columna en un microtubo eppendorf de 1.5 ml.
3. Homogenizar a sangre por inversión y tomar 0.1–0.2 mL.
4. Transferir la muestra en la columna incluida en el kit.
5. Adicionar reactivo de lisis celular e incubar de acuerdo a especificaciones del kit comercial.
6. Realizar lavados de la columna con soluciones específicas del kit.
7. Eluir el ADN de la membrana con agua inyectable o agua comercial libre de nucleasas.
8. Almacenar a -20 °C hasta su utilización.

EXTRACCIÓN DE ADN DE MUCOSA ORAL CON KIT COMERCIAL:

La Jefa del Laboratorio, las Químicas, los Químicos y la Química o Químico Investigador son responsables de:

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 11 DE: 14

1. Centrifugar el tubo que contiene la muestra de mucosa oral durante 5 minutos a 3000 rpm.
2. Decantar el sobrenadante dejando unos 200 µl de volumen.
3. Pasar el botón a un tubo de 1.5 ml y agregar 180 µl de buffer de lisis, 30 µl de proteinasa K, mezclar en el vortex por 15 segundos.
4. Colocar el tubo con la muestra en una incubadora a 56 °C.
5. Agregar 200 µl de buffer de lisis, cerrar el tubo y agitar por 15 segundos.
6. Agregar 50 µl de etanol (96–100%), cerrar el tubo y mezclar en vortex por 15 segundos. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente (15–25 °C).
7. Centrifugar a 14 rpm por 3 minutos y transferir con una micropipeta todo el lisado a la columna.
8. Cerrar la columna y centrifugar a 8000 rpm por 1 minutos.
9. Colocar la columna en un tubo de colecta (nuevo) y desechar la solución centrifugada.
10. Agregar a la columna 500 µl de Buffer de lavado 1 y centrifugar a 14000 rpm por 2 minutos.
11. Colocar la columna en un tubo de colecta y desechar la solución centrifugada.
12. Agregar a la columna 650 µl de Buffer de lavado 2 y centrifugar a 14000 rpm por 2 minutos.
13. Colocar la columna en un tubo de colecta, adicionar 650 µl de etanol (96–100%) y centrifugar a 14000 rpm por 2 minutos.
14. Colocar la columna en un tubo de colecta y desechar la solución centrifugada.
15. Centrifugar a 14,000 rpm por 3 minutos y dejar la columna 3 minutos a temperatura ambiente.
16. Colocar la columna en un tubo limpio de 1.5 ml, adicionar 50 µl de Buffer de elución o agua inyectable, incubar 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto a 14,000 rpm por 2 minutos.

CUANTIFICACIÓN DEL ADN (PUREZA):

1. Medir 2 uL de ADN purificado y colocar en un equipo de espectrofotometría con sistema de retención de muestras de microvolumen. para determinar su concentración y pureza.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 12 DE: 14

ELECTROFORESIS DE ADN (INTEGRIDAD):

1. Realizar corrida electroforética de 2 uL de ADN genómico (véase IO-3 Electroforesis en gel de agarosa).

9.0 RESULTADOS

9.1 CÁLCULOS Y CONVERSIONES

No Aplica.

9.2 UNIDADES Y REDONDEO DE NÚMEROS

No Aplica.

9.3 REPORTE DE RESULTADOS

No Aplica.

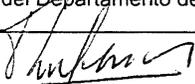
9.4 INTERVALOS DE REFERENCIA

9.4.1 PUREZA

Parámetro	Calidad	
	Óptima	Aceptable
Contaminación con proteínas o compuestos aromáticos índice A_{260}/A_{280}	1.8 – 2.0	1.7
Contaminación con sales o compuestos orgánicos índice A_{260}/A_{230}	>1.8	1.5
Cantidad, ng/ μ L	>100	>20

9.4.2 INTEGRIDAD

Parámetro	Integridad
Banda definida en la parte superior del gel.	Alta

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 13 DE: 14

Presencia simultánea de la banda superior y una ligera mancha o sombra.	Adecuada
Ausencia de banda definida y presencia de mancha o sombra concentrado en la parte superior del gel.	Parcialmente degradado
Mancha o sombra concentrada en la parte inferior del gel.	Totalmente degradado

9.5 LINEALIDAD E INTERVALO REPORTABLE

De acuerdo a lo especificado en el punto 9.4.

9.6 CRITERIOS DE REPETICIÓN

Cuando los valores de calidad del ADN no cumplan con las especificaciones del punto 139.4 se realiza la extracción nuevamente.

9.7 VALORES CRÍTICOS

No Aplica.

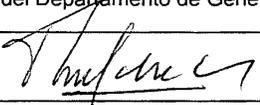
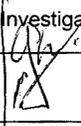
10.0 INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES DEL MÉTODO

EXTRACCIÓN MANUAL:

1. Se requiere experiencia para evitar que el ADN se fragmente.
2. Alto rendimiento, disminuye pureza.
3. Contaminación del ADN con solventes orgánicos que pueden interferir con aplicaciones posteriores.

EXTRACCIÓN AUTOMATIZADA:

1. Menor rendimiento, mayor pureza.
2. El rendimiento de los kits depende del tipo de tejido y la cantidad de muestra inicial, así como de la capacidad de unión a la membrana de la columna.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	2. Instrucción Operativa para Extracción de Ácidos Nucleicos		HOJA: 14 DE: 14

11.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 11.1 Ácido desoxirribonucleico:** Es un tipo de ácido nucleico que codifica la información genética.
- 11.2 Ácido nucleico:** Moléculas portadoras de información celular que determinan las características hereditarias de todos los seres vivos.
- 11.3 Decantar:** Separar sustancias no miscibles de diferente densidad en un medio líquido.
- 11.4 Lisis celular:** Es consiste en la rotura de membrana celular de bacterias o células que provoca la salida de material biológico.
- 11.5 Sobrenadante:** Es el líquido que queda sobre un sedimento o precipitado, después de producida la sedimentación. El estrato más líquido en un digestor de lodos.

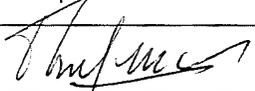
12.0 FORMATOS, REFERENCIAS Y BIBLIOGRÁFICA

Miller S.A., Dykes D.D. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Research; 16(3): p. 1215; 1988.

Parimoo S., P arimoo B. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Volume 162. Cap. 6. Sample preparation in DNA analysis, p. 271-290. 2003.

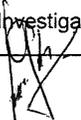
13.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Versión	Fecha	Propósito de la Revisión	Realizado por

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

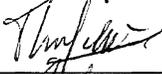
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	3. Instrucción Operativa para Electroforesis en Gel de Agarosa		HOJA: 1 DE: 11

3. INSTRUCCIÓN OPERATIVA PARA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	3. Instrucción Operativa para Electroforesis en Gel de Agarosa		HOJA: 2 DE: 11

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	
Clave: IO-GEN-03	Versión: 0

	Nombre	Cargo	Firma	Fecha
Elaboró	Q.F.B. MARÍA A. LÓPEZ HERNÁNDEZ	JEFA DE LABORATORIO		07-10-2022
Revisó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022
Aprobó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022

Revisión Bi-Anual		
<i>La firma indica que el procedimiento se mantiene SIN modificaciones</i>		
Nombre	Firma	Fecha

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	3. Instrucción Operativa para Electroforesis en Gel de Agarosa		HOJA: 3 DE: 11

1.0 RESPONSABILIDADES

La Jefa de Laboratorio, la Química y/o el Químico Investigador cumplen con lo descrito en este procedimiento.

2.0 PRINCIPIO

Reacción

La separación se realiza comúnmente en geles de agarosa que funcionan como filtro. Su principal uso es la separación de mezclas de macromoléculas, especialmente de ácidos nucleicos (ADN o ARN) o proteínas.

Los ácidos nucleicos disponen de una carga eléctrica negativa y cuando son separados en el gel se dirigirán al polo positivo migrando las moléculas de menor a mayor tamaño.

Aplicación Clínica

Es una técnica con usos diversos desde analizar la calidad de los ácidos nucleicos, conocer el tamaño o peso molecular de estas moléculas, conocer el tamaño de un fragmento amplificado por PCR, como proceso previo a la purificación para la secuenciación o como un paso previo a otros métodos de biología molecular, como la identificación secuencias específicas de genes en el área de diagnóstico clínico.

3.0 RECOLECCIÓN DE MUESTRA

3.1 PREPARACIÓN DE LA PERSONA BENEFICIARIA

No Aplica.

3.2 TIPO DE MUESTRA

ADN genómico purificado y cuantificado (véase IO Extracción de ácidos nucleicos).

3.3 CONDICIONES DE LA MUESTRA

Volumen requerido

- a) Determinar integridad: 5 ul de ADN genómico concentrado (véase IO Extracción de ácidos nucleicos).
- b) a) Productos de PCR: 10 ul del amplificado (véase IO-6 Reacción en Cadena de la Polimerasa).

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	3. Instrucción Operativa para Electroforesis en Gel de Agarosa		HOJA: 5 DE: 11

- a) EDTA Stock 0.5, pH 8.
- b) EDTA 186.1 g.
- c) NaOH 19 a 20 g para ajustar Ph.
- d) Aforar a 1.0 lt con agua destilada. Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

TBE Stock 10X

- a) Trizma base 108.0g.
- b) Ácido bórico 55.0g.
- c) EDTA 40.0 ml del stock o.5, pH 8.
- d) Aforar a 1.0 lt con agua destilada. Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

TBE 1X

- a) TBE 10 X 10.0 ml
- b) Aforar a 100 ml con agua destilada

BUFFER DE CARGA

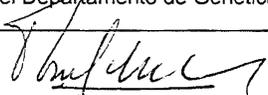
- a) Azul de bromofenol (0.25%) 0.25 g.
- b) Xilen-cianol (0.25%) 0.25 g.
- c) Glicerol (30%) 30 ml.

Disolver el glicerol en agua destilada y homogenizar la solución con agitación, posteriormente adicionar los colorantes y aforar a 100ml con agua destilada.

Nota: puede utilizarse el buffer de carga comercial incluido en los kits de Mezclas de PCR.

GEL DE AGAROSA (% PESO/VOLUMEN)

- a) Agarosa Concentración final.
1.0 g 1 %

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	3. Instrucción Operativa para Electroforesis en Gel de Agarosa		HOJA: 6 DE: 11

2.0 g 2 %
3.0 g 3 %

Diluido en 100 ml de TBE 1 X

AGAROSA %	ESTÁNDAR	ALTA FUERZA DEL GEL	GEL DE BAJA TEMPERATURA DE FUSIÓN	GEL DE BAJA TEMPERATURA DE FUSION Y BAJA VISCOSIDAD
0.3	1 kb - 40 kb			
0.5	700 pb - 25 kb			
0.8	500 pb - 15 kb	800 pb - 10 kb	800 pb - 10 kb	
1.0	250 pb - 12 kb	400 pb - 8 kb	400 pb - 8 kb	
1.2	150 pb - 6 kb	300 pb - 7 kb	300 pb - 7 kb	
1.5	80 pb - 4 kb	200 pb - 4 kb	200 pb - 4 kb	
2.0	60 pb - 2.5 kb	100 pb - 3 kb	100 pb - 3 kb	
3.0			50 pb - 1 kb	50 pb - 1 kb
4.0				100 pb - 500 pb
6.0				10 pb - 100 kb

Tabla 1 Rango de separación de tamaños de ADN en función de la concentración y tipo de agarosa utilizada.

ADN DILUCIÓN 1:10

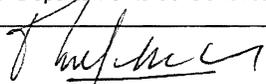
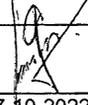
- a) 1ul de ADN concentrado diluido en 9ul de agua inyectable.

4.3 ACEPTABILIDAD

- a) Determinada por la vigencia de la fecha de caducidad de los reactivos.

4.4 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- a) Todos los reactivos se almacenan a temperatura ambiente.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	3. Instrucción Operativa para Electroforesis en Gel de Agarosa		HOJA: 7 DE: 11

5.0 CALIBRACIÓN

5.1 IDENTIFICACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.2 PREPARACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.3 PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

5.4 ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y FRECUENCIA DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

6.0 CONTROL DE CALIDAD

6.1 IDENTIFICACIÓN DE CONTROLES

No Aplica.

6.2 PREPARACIÓN DEL CONTROL

No Aplica.

6.3 FRECUENCIA DE USO DE CONTROLES

No Aplica.

6.4 ALMACENAMIENTO

No Aplica.

6.5 PROCEDIMIENTO DEL USO DE LOS CONTROLES

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	3. Instrucción Operativa para Electroforesis en Gel de Agarosa		HOJA: 8 DE: 11

6.6 LÍMITES DE ACEPTABILIDAD Y ACCIONES CORRECTIVAS

No Aplica.

6.7 REGISTRO Y ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS DE CONTROL DE CALIDAD

No Aplica.

6.8 EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD

No Aplica.

6.9 ALTERNATIVAS EN AUSENCIA DE CONTROLES

Incluir en cada corrida electroforética un estándar comercial de Peso Molecular (incluyen varios fragmentos de tamaño conocido y concentración aproximada de ADN).

7.0 EQUIPO NECESARIO

- Camara de electroforesis horizontal.
- Equipo de fotodocumentación.
- Fuente de poder.

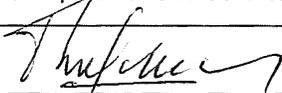
8.0 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

La Jefa de Laboratorio, la Química y/o el Químico Investigador son responsable de:

1. Pesar la agarosa y disolver en 100 ml de buffer TBE 1X (véase tabla 1).
2. Calentar la mezcla en un horno de microondas hasta lograr una mezcla homogénea.

Nota: evite la ebullición violenta de la mezcla.

3. Adicionar con micropipeta 3 ul de bromuro de etidio (aproximadamente a una concentración de 200-500 ng/ml en el gel de agarosa) y homogenizar la mezcla.
4. Colocar y fijar en el soporte de geles la base, o utilizar cinta adhesiva en ambos extremos de la bandeja.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	3. Instrucción Operativa para Electroforesis en Gel de Agarosa		HOJA: 9 DE: 11

5. Dejar enfriar la agarosa hasta 60 °C y verter la mezcla en la base de gel, colocar el peine y dejar enfriar hasta que solidifique la agarosa (20 minutos aproximadamente).
6. Introducir el gel (soporte) en la cámara de electroforesis y cubrirlo con el buffer TBE1X.
7. Depositar de 2-20 µg/µL de muestra en cada pozo con buffer de carga.
8. Correr el gel a 70-85 volts 30 a 60 minutos y una vez terminada la corrida retirar de la cámara de electroforesis.
9. Visualizar en un equipo de foto documentación, analizar y documentar resultados.

Nota: utilizar los guantes durante todo el procedimiento ya que el bromuro de etidio es un agente mutágeno y cancerígeno.

9.0 RESULTADOS

9.1 CÁLCULOS Y CONVERSIONES

No Aplica.

9.2 UNIDADES Y REDONDEO DE NÚMEROS

No Aplica.

9.3 REPORTE DE RESULTADOS

No Aplica.

9.4 LINEALIDAD E INTERVALO REPORTABLE

Integridad de ADN: de acuerdo a lo especificado en el punto 9.4.2 de la IO-2 Extracción de ácidos nucleicos.

Productos de PCR: tamaño esperado de acuerdo al estándar de Peso Molecular.

9.5 CRITERIOS DE REPETICIÓN

Pérdida de la muestra por exceder el tiempo de corrida.

Mal preparación del gel afecta la calidad de la corrida.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	3. Instrucción Operativa para Electroforesis en Gel de Agarosa		HOJA: 10 DE: 11

9.7 VALORES CRÍTICOS

No aplica.

10.0 INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES DEL MÉTODO

1. Calidad de la muestra: Baja concentración o alta concentración de sales en la muestra de ADN afectan la migración en el gel.
2. La electroforesis en gel de agarosa tiene un límite superior de unas 40-50 kb en el tamaño de las moléculas de ADN que puede separar. No es posible separar el producto de digestiones con enzimas de restricción de corte infrecuente o separar cromosomas enteros (los cromosomas de eucariotas inferiores tienen tamaños de entre 0.2 y 12 Mb).
3. Concentraciones de agarosa hasta un 0.1 o 0.2 % pueden incrementar el límite de separación hasta los 750 pb, sin embargo, son frágiles y difíciles de manipular.

11.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

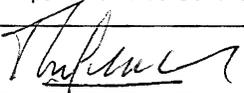
- 11.1 Ácidos nucleicos:** Moléculas portadoras de información celular que determinan las características hereditarias de todos los seres vivos.
- 11.2 Agarosa:** Polisacárido utilizado como matriz en la preparación de geles para separar moléculas de ADN.
- 11.3 Electroforesis:** Técnica de laboratorio que se usa para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño y carga eléctrica.

12.0 FORMATOS, REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

Stellwagen, N. C. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. Electrophoresis, 30(SUPPL. 1), 188-195, 2009

Upcroft, P., & Upcroft, J. A. "Comparison of properties of agarose for electrophoresis of DNA," Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, vol. 618 no. (1-2), pp. 79-93, 1993.

Cole, K. D., & Tellez, C. M. (2002). Separation of large circular DNA by electrophoresis in agarose gels. Biotechnology progress, 18(1), 82-87.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	3. Instrucción Operativa para Electroforesis en Gel de Agarosa		HOJA: 11 DE: 11

Green, M. R., & Sambrook, J. (2019a). Agarose gel electrophoresis. Cold Spring Harbor Protocols, 2019(1), pdb. prot100404.

Johnson, P. H., & Grossman, L. I. (1977). Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double-and single-stranded DNAs. Biochemistry, 16(19), 4217-4225.

Schleef, M. (2008). Plasmids for therapy and vaccination: John Wiley & Sons. Schmidt, T., Friehs, K., & Flaschel, E. (2001). Structures of plasmid DNA. Plasmids for therapy and vaccination, 29-43

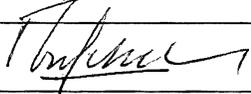
13.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Versión	Fecha	Propósito de la Revisión	Realizado por

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small> 	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 1 DE: 17

4. INSTRUCCIÓN OPERATIVA PARA CARIOTIPO

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 2 DE: 17

CARIOTIPO	
Clave: IO-GEN-04	Versión: 0

	Nombre	Cargo	Firma	Fecha
Elaboró	Q.F.B. MARÍA A. LÓPEZ HERNÁNDEZ	JEFA DE LABORATORIO		07-10-2022
Revisó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022
Aprobó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022

Revisión Bi-Anual		
<i>La firma indica que el procedimiento se mantiene SIN modificaciones</i>		
Nombre	Firma	Fecha

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 3 DE: 17

1.0 RESPONSABILIDADES

La Jefa de Laboratorio, Química y/o Químico del área de citogenética cumplen con lo descrito en este procedimiento en apego a las Acciones Esenciales de Seguridad del Paciente.

2.0 PRINCIPIO

Reacción

El análisis citogenético clásico o cariotipo tiene un papel importante en el estudio de las anomalías cromosómicas constitucionales y adquiridas. Permite la detección de grandes alteraciones genómicas, incluidas aneuploidías, reordenamientos estructurales cromosómicos equilibrados y desequilibrados de al menos 5–10 Mb de tamaño, así como mosaicismos.

Aplicación clínica

El cariotipo en médula ósea es útil en el diagnóstico de enfermedades hematológicas tales como leucemias mieloides agudas, síndromes mielodisplásicos, leucemias linfoblásticas agudas, linfomas, anemias y otros desordenes hematológicos. También es útil en el seguimiento de la evolución de las personas beneficiarias en tratamiento y para determinar si un trasplante de médula ósea se implantó adecuadamente.

El cariotipo en linfocitos de sangre periférica se utiliza para el diagnóstico de síndromes genéticos como Down, Klinefelter y Turner en donde se identifican ganancias o pérdidas de cromosomas y rearrreglos cromosómicos.

3.0 RECOLECCIÓN DE MUESTRA

3.1 PREPARACIÓN DE LA PERSONA BENEFICIARIA

3.1.1 Cariotipo en Médula ósea.

No aplica, la toma de muestra se realiza en otra unidad administrativa.

3.1.2 Cariotipo en Sangre periférica.

De acuerdo a lo especificado en la IO-1 Toma de muestras biológicas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 4 DE: 17

3.2 TIPO DE MUESTRA

Médula ósea

Las Médicas, Médicos y Residentes del Departamento de Hematología y Oncología son responsables de realizar la toma de muestra de médula ósea en la unidad de Radio Oncología y enviarla al Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky con la solicitud correspondiente firmada por la Médica o Médico que efectuó el procedimiento para la realización de los estudios citogenéticos de las personas beneficiarias del Instituto.

Sangre periférica

De acuerdo a lo especificado en la IO-1 Toma de muestras biológicas.

3.3 CONDICIONES DE LA MUESTRA

Volumen requerido

Tipo de Muestra	Volúmen	
	Óptimo	Mínimo
Médula ósea	5 mL	2mL*

Nota: la muestra de médula ósea: El volumen puede ser menor de 2 mL, estar diluída, hemodiluida o con pequeños coágulos. Debido a lo difícil y doloroso de la toma de muestra estas se procesan de manera habitual.

3.3.1 Recipiente de recolección:

Médula ósea

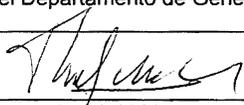
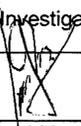
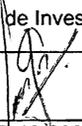
Recolectar la muestra en una jeringa de 5 ó 10 mL bañada con 0.2 ml de heparina.

Sangre periférica

De acuerdo a lo especificado en la IO-1 Toma de muestras biológicas.

3.3.2 Identificación de la muestra:

De acuerdo a lo especificado en la IO-1 Toma de muestras biológicas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 5 DE: 17

3.3.3 Factores de rechazo:

Incumplimiento del punto 3.3.1 para muestras de médula ósea y puntos 3.2 y 3.3 de IO-1 Toma de muestras biológicas.

3.4 CONDICIONES DE MANEJO Y ALMACENAMIENTO

Cariotipo en Medula ósea:

La muestra está contenida en jeringas con capuchón a temperatura ambiente.

Sembrar las muestras en las siguientes 2 horas de su recepción.

Cariotipo en Sangre periférica:

La muestra está contenida en jeringas con capuchón a temperatura ambiente o en tubos con heparina cerrados.

Las muestras son manipuladas sólo por la servidora y/o el servidor público autorizado del área de citogenética.

4.0 REACTIVOS

- Medio Marrow Max (médula ósea)
- Medio de cultivo RPMI (sangre periférica)
- Fitohemaglutinina
- Aceite de inmersión
- Agua destilada
- Xilol
- Colcemid de 10 ug/ml
- Cloruro de potasio
- Metanol

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 6 DE: 17

- Etanol
- Hipoclorito de sodio
- Acido acético glacial
- Tripsina
- Entellan
- Heparina de 5000 UI/mL
- Eosina azul de metileno
- EDTA
- Fosfato de potasio monobásico
- Fosfato de sodio dibásico
- Cloruro de sodio
- Bicarbonato de sodio
- Buffer hepes 1 M

4.1 MATERIALES

- Ligadura
- Jeringa estéril desechable de 10 mL
- Jeringa estéril desechable de insulina de 1 mL
- Torundas de algodón en alcohol.
- Frascos de vidrio con tapón de hule
- Pipetas serológicas de 10 mL
- Marcador indeleble

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 7 DE: 17

- Gasas limpias
- Pizeta con alcohol al 70 %
- Pizeta con hipoclorito de sodio al 5 %
- Frascos de vidrio de 100 mL
- Tubos de centrifuga de 15 mL
- Pipetas pasteur
- Bulbos para pipeta pasteur
- Matraz kitazato
- Portaobjetos con pantalla esmerilada
- Cubreobjetos de 22X50
- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- Vasos koplín de 50 mL
- Probetas de 50 mL
- Vasos de precipitado de 50 mL

4.2 PREPARACIÓN

- Solución hipotónica: cloruro de potasio 0.075 M (5.592 g en 1000 mL de agua destilada).
- Fijador Carnoy: metanol: ácido acético glacial, 3:1.
- Solución isotónica de cloruro de sodio: 9g en 1000 mL de agua destilada.
- Buffer de fosfatos: fosfato de potasio monobásico 8.1654 g y fosfato de sodio dibásico 8.5479 g en 1000 mL de agua destilada ajustar pH a 6.8 con solución de bicarbonato de sodio.
- Tripsina: 60 mg en 50 mL de cloruro de sodio isotónico, ajustar pH a 8 con Bicarbonato de sodio: 7 g en 100 mL de agua destilada.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 8 DE: 17

- Solución de EDTA: 1g en 50 mL de agua destilada.
- Colorante eosina azul de metileno: 1.5 mL en 13.5 mL de buffer de fosfatos.
- Hipoclorito de sodio al 5 % en agua.
- Etanol al 70 %.
- Bromuro de etidio 1 mg/mL.

4.3 ACEPTABILIDAD

- Verificar que los frascos de medios de cultivo y fitohemaglutinina no presentan turbidez o cambio de coloración que puedan indicar contaminación.

4.4 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- Medio de cultivo RPMI, tripsina, heparina y fitohemaglutinina se almacenan a 4 °C.
- Medio Marrow Max se almacena a -20 °C.
- El resto de los reactivos se almacenan a temperatura ambiente.

5.0 CALIBRACIÓN

5.1 IDENTIFICACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.2 PREPARACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.3 PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

5.4 ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y FRECUENCIA DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 9 DE: 17

6.0 CONTROL DE CALIDAD

6.1 IDENTIFICACIÓN DE CONTROLES

No Aplica.

6.2 PREPARACIÓN DEL CONTROL

No Aplica.

6.3 FRECUENCIA DE USO DE CONTROLES

No Aplica.

6.4 ALMACENAMIENTO

No Aplica.

6.5 PROCEDIMIENTO DEL USO DE LOS CONTROLES

No Aplica.

6.6 LÍMITES DE ACEPTABILIDAD Y ACCIONES CORRECTIVAS

No Aplica.

6.7 REGISTRO Y ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS DE CONTROL DE CALIDAD

No Aplica.

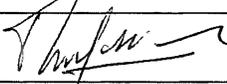
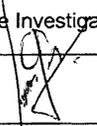
6.8 EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD

No Aplica.

6.9 ALTERNATIVAS EN AUSENCIA DE CONTROLES

Seleccionar aleatoriamente una muestra (médula ósea o sangre periférica) procesada y reportada previamente.

La Química y/o el Químico del área realiza el análisis microscópico de laminillas bandeadas del caso seleccionado, de acuerdo a lo descrito en el procedimiento del ensayo.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 10 DE: 17

Elaborar el reporte de resultado que incluya los hallazgos observados, de acuerdo a la nomenclatura del Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN), resolución de bandas y número de metafases analizadas.

Determinar la concordancia de los resultados entre los analistas.

Determinar la concordancia con el reporte previo.

7.0 EQUIPO NECESARIO

- Centrífuga clinica
- Guantes desechables
- Gradillas
- Incubadora
- Campana de flujo laminar
- Baño maria
- Microscopio óptico
- Estación Citogenética Automatizada
- Micropipeta de 100µL
- Balanza analítica
- Refrigerador y congelador
- Potenciómetro
- Cronómetro
- Pinzas

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 11 DE: 17

8.0 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

La Jefa de Laboratorio, la Química y/o el Químico son responsables de:

1. Limpiar la superficie y paredes internas de la campana de seguridad biológica con hipoclorito de sodio al 5 % y alcohol al 70%.
2. Introducir en la campana el material estéril y reactivos a utilizar (pipetas, frascos, fitohemaglutinina, medio cultivo, muestra).
3. Rotular los frascos con número de caso, número de frasco y fecha.
4. Descongelar medios de cultivo, la fitohemaglutinina y colocarlos en baño maría a 37 °C. por 15 minutos.

Siembra

1. Médula ósea (sembrar 2 frascos por muestra).
2. Adicionar 2.5 mL de hepes 1 M cada vez que se abre un frasco nuevo.
3. Colocar en cada uno de los frascos 5 mL de medio Marrow Max sin tocar paredes o boca de los frascos con la pipeta, de lo contrario cambiar la pipeta.
4. Mezclar la muestra por inversión durante 1 minuto, desechar la primera gota sobre una torunda de algodón y adicionar 12 gotas de médula ósea a cada frasco. En caso de muestras diluidas se adiciona mayor cantidad de muestra.
5. Homogenizar y colocar los frascos en la incubadora a 37 °C por 24 horas.
6. Sangre periférica (sembrar 2 frascos por muestra).
7. Adicionar en cada frasco 4.5 mL de medio RPMI 1640, sin tocar paredes o boca de los frascos con la pipeta, de lo contrario cambiar la pipeta.
8. Adicionar en cada frasco 0.1 mL de fitohemaglutinina con una jeringa de insulina y homogeneizar con movimientos circulares.
9. Homogenizar la muestra por inversión durante 1 minuto, desechar la primera gota y adicionar 12 gotas de sangre a cada frasco.
10. Homogenizar y colocar los frascos en la incubadora a 37 °C por 72 horas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 12 DE: 17

Nota: muestras de sangre periférica

1. La siembra se realiza los lunes, martes o viernes ya que el cultivo requiere de 72 horas de incubación.
2. En caso de recibir muestra el miércoles se realiza un cultivo a 48 horas, se resiembra el viernes, en caso de no haber crecimiento.
3. Las muestras recibidas el jueves se conservan a temperatura ambiente y se siembran al día siguiente.

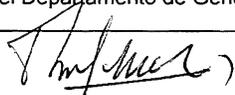
Cosecha

Médula ósea

1. Adicionar a cada frasco 50 ul de solución de bromuro de etidio 10mg/ml, incubar a 37°C por 30 minutos.

Nota: los cultivos de sangre periférica se procesan como se indica en punto 2.

2. Verter el contenido de cada frasco a un tubo de centrifuga y agregar 0.05 mL de colcemid por tubo. Mezclar con pipeta pasteur o por inversión.
3. Incubar por 30 minutos a 37 °C en el baño maría.
4. Centrifugar a 1200 RPM durante 10 minutos.
5. Remover el sobrenadante por sistema de vacío dejando 0.2 a 0.3 ml del mismo.
6. Agregar 10 mL de solución hipotónica a cada tubo y mezclar, colocar dentro del baño maría a 37°C por 30 minutos.
7. Agregar 0.5 mL de fijador Carnoy recién preparado a 4 °C lentamente y resuspender suavemente la mezcla.
8. Centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos.
9. Remover el sobrenadante de ambos tubos dejando aproximadamente 0.5 mL, y mezclar el botón con la pipeta pasteur.
10. Agregar 10 ml de fijador carnoy y resuspender cuidadosamente y centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 13 DE: 17

11. Remover el sobrenadante de ambos tubos dejando aproximadamente 0.5 ml y mezclar el botón con la pipeta pasteur.
12. Agregar 5 mL de fijador carnoy y resuspender cuidadosamente, centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos.
13. Repetir puntos 14 y 15 hasta que el sobrenadante este claro.
14. Hacer una laminilla de prueba de cada tubo para ajustar la altura del goteo. Ver en contraste de fase y decidir sobre la hipotonia, crecimiento, concentración y calidad de los cromosomas obtenidos.
15. Seleccionar tubos para la preparación de laminillas y y almacenar el resto del material a 20° C.
16. Agregar 1 ml de fijador, resuspender cuidadosamente, pasar el contenido a un tubo Eppendorf (aproximadamente 1.5 ml), identificar cada tubo y guardar a 4 °C.

Bandeo

1. Incubar a 37 °C laminillas por 5-6 días (etapa de maduración).
2. La laminilla se sumerge en vasos Koplín en el siguiente orden:
 - a) Solución salina isotónica de cloruro de sodio por 30 segundos.
 - b) Solución de tripsina: realizar pruebas para determinar el tiempo óptimo en la que se aprecian las bandas oscuras y claras de los cromosomas, inicialmente se empieza con 30 segundos.
 - c) Solución de EDTA por 10 segundos.
 - d) Buffer de fosfatos por 10 segundos.
 - e) Segundo vaso Koplín con buffer de fosfatos por 10 segundos.
3. Colorante eosina azul de metileno, determinar el tiempo óptimo de tinción de los cromosomas, evitar dejarlos muy oscuros o muy claros, el tiempo inicial es de 1 minuto.

Análisis Microscópico

1. Cariotipo en Médula ósea.
2. Analizar 20 a 30 metafases (células), conforme a lo requerido.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 14 DE: 17

3. Agotar el análisis de metafases identificadas en muestras con poco material.

4. Cariotipo en sangre periférica.

5. Analizar 30 a 40 metafases (células), según se requiera.

Nota: agotar el análisis de metafases identificadas en muestras con poco material

6. Revisar las laminillas en microscópio óptico comenzando desde el borde derecho con el objetivo 40X de manera progresiva hacia la izquierda descartando aquellas metafases en las que no se observan bien los cromosomas (metafases cerradas, degradadas o poco bandeadas) y las que estén rotas, evitar zonas en las que hay cromosomas dispersos.

7. Localizar metafases y adicionar aceite de inmersión para su análisis con el objetivo 100 X.

8. Identificar cada par de cromosomas homólogos y comparar el patrón de bandas cromosómico.

9. Verificar en el ideograma de referencia del par correspondiente al Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) e identificar rearrreglos cromosómicos estructurales o numéricos en la metafase analizada.

10. Tomar fotografías de metafases normales y anormales en la Estación Citogenética.

11. Armar cariotipos e identificar con ayuda del Software de Análisis de la Estación Citogenética las anomalías cromosómicas encontradas o cariotipos con patrón de bandas normal.

12. Montar las laminillas analizadas con entellan y un cubreobjeto para proteger la preparación, colocar en cartoncillos identificadas con el No. de caso y archivar por año en una caja de cartón. Al terminar el año en curso se transfieren a un archivero donde se resguardan por 5 años.

Nota: las laminillas se utilizan nuevamente en situaciones excepcionales para el seguimiento de la persona beneficiaria.

9.0 RESULTADOS

9.1 CÁLCULOS Y CONVERSIONES

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 15 DE: 17

9.2 UNIDADES Y REDONDEO DE NÚMEROS

No Aplica.

9.3 REPORTE DE RESULTADOS

Elaborar informe escrito de acuerdo a lo establecido en el formato 9.2 Procedimiento para realizar estudios especializados en Citogenética y Biología molecular, Manual de Procedimientos del Departamento de Genética).

9.4 INTERVALOS DE REFERENCIA

No Aplica.

9.5 LINEALIDAD E INTERVALO REPORTABLE

No Aplica.

9.5 CRITERIOS DE REPETICIÓN

No crecimiento de cultivos.

Mala calidad de la morfología de los cromosomas que haga imposible un análisis microscópico confiable.

9.7 VALORES CRÍTICOS

No Aplica.

10.0 INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES DEL MÉTODO

1. Escaso material de análisis.
2. Mala calidad de las metafases.
3. Baja resolución del bandeó.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 16 DE: 17

11.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 11.1 Análisis citogenético:** Proceso por el cual se analizan las células de una muestra de tejido, sangre, médula ósea o líquido amniótico para identificar cambios en los cromosomas, incluso cromosomas rotos, faltantes, sobrantes o reordenamientos de cromosomas.
- 11.2 Aneuploidias:** Cualquier número de cromosomas que no es múltiplo exacto del número haploide normal (23) de un individuo.
- 11.3 Cariotipo:** Es la colección de cromosomas de un individuo y es utilizado para buscar números o estructuras anormales de los cromosomas. Conjunto completo de los cromosomas de un individuo.
- 11.4 Enfermedades hematológicas:** Producidas por alteración en el número o función de las células producidas por la médula ósea lo cual provoca una serie de consecuencias clínicas.
- 11.5 Leucemias linfoblásticas agudas:** Tipo de cáncer producido cuando una célula de la médula ósea presenta cambios en su material genético.
- 11.6 Linfocitos:** Tipo de glóbulo blanco que es parte del sistema inmune.
- 11.7 Linfoma:** Tipo de cáncer que comienza en las células del sistema linfático.
- 11.8 Síndrome de Klinefelter:** Es una afección que ocurre en los varones cuando tienen un cromosoma X adicional.
- 11.9 Sobrenadante:** Es el líquido que queda sobre un sedimento o precipitado, después de producida la sedimentación. El estrato más líquido en un digestor de lodos.

12.0 FORMATOS, REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

Dracopoli NC, haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR. Current protocols in human genetics. John Wiley and Sons, Inc, USA, 1994.

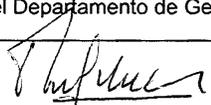
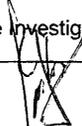
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	4. Instrucción Operativa para Cariotipo		HOJA: 17 DE: 17

Rooney DE and Czepulkowski BH. Human cytogenetics: apractical approach. Volumen I, 2a. edición. Oxford university press, New York, USA, 1992.

13.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Versión	Fecha	Propósito de la Revisión	Realizado por

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	5. Instrucción Operativa para Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes "FISH"		HOJA: 1 DE: 12

**5. INSTRUCCIÓN OPERATIVA PARA HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDAS
FLUORESCENTES "FISH"**

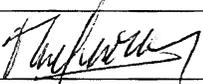
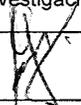
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	5. Instrucción Operativa para Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes "FISH"		HOJA: 2 DE: 12

HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDAS FLUORESCENTES "FISH"	
Clave: IO-GEN-05	Versión: 0

	Nombre	Cargo	Firma	Fecha
Elaboró	Q.F.B. MARÍA A. LÓPEZ HERNÁNDEZ	JEFA DE LABORATORIO		07-10-2022
Revisó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022
Aprobó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022

Revisión Bi-Anual <i>La firma indica que el procedimiento se mantiene SIN modificaciones</i>		
Nombre	Firma	Fecha

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	5. Instrucción Operativa para Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes “FISH”		HOJA: 3 DE: 12

1.0 RESPONSABILIDADES

La Jefa de Laboratorio, Química y/o Químico cumplen con lo descrito en este procedimiento.

2.0 PRINCIPIOS

Reacción

La hibridación *in situ* Fluorescente o FISH, se fundamenta en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para hibridarse entre sí por complementaridad de bases, es decir, la unión de un fragmento de ADN homólogo con la secuencia de interés. Las sondas de hibridación marcadas con fluorocromos emiten fluorescencia, la cual es detectada por medio de un microscopio de epifluorescencia. En metafases obtenidas de cultivos de médula ósea o sangre periférica puede detectarse ausencia, presencia, fusión o fragmentación de las señales fluorescentes correspondientes a las sondas aplicadas.

Aplicación Clínica

Esta técnica permite la identificación de aberraciones cromosómicas clínicamente significativas, se puede realizar en metafases o células en interfase que no se dividen, y puede detectar anomalías genómicas con una resolución de 150 a 900 kb (dependiendo del tamaño de la sonda) no identificables por las técnicas citogenéticas convencionales.

Permite confirmar o descartar síndromes por microdelección/duplicación, detectar anomalías numéricas (aneuploidías) y es una herramienta importante para confirmar reordenamientos cromosómicos que se sospechan después de la evaluación citogenética, así como la detección de bajos niveles de mosaicismo. En desordenes hematológicos como LAM-M3, LGC, otros procesos mieloproliferativos y ciertos tipos de cáncer, es útil en la identificación de rearrreglos complejos, microdelecciones, microduplicaciones y translocaciones típicas de leucemias, que no es posible identificar con el cariotipo convencional.

3.0 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

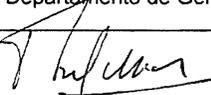
3.1 PREPARACIÓN DE LA PERSONA BENEFICIARIA

No Aplica.

3.2 TIPO DE MUESTRA

De acuerdo a lo especificado en la IO-1 Toma de muestras biológicas.

De acuerdo a lo especificado en el punto 3.2.1 para muestras de médula ósea de la IO-3 Cariotipo.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	5. Instrucción Operativa para Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes "FISH"		HOJA: 4 DE: 12

3.3 CONDICIONES DE LA MUESTRA

Volumen Requerido

De acuerdo a lo especificado en la IO-1 Toma de muestras biológicas (muestras de sangre periférica).

De acuerdo a lo especificado en el punto 3.2.2 para muestras de medula ósea de la IO-3 Cariotipo.

3.3.1 Recipiente de recolección:

De acuerdo a lo especificado en la IO-1 Toma de muestras biológicas (muestras de sangre periférica).

De acuerdo a lo especificado en el punto 3.2.3 para muestras de medula ósea de la IO-3 Cariotipo.

3.3.2 Identificación de la muestra:

No Aplica.

3.3.3 Factores de rechazo:

Incumplimiento de los criterios establecidos en el punto 3 de las instrucciones operativas IO-1 y IO-3.

3.4 CONDICIONES DE MANEJO Y ALMACENAMIENTO

De acuerdo a lo especificado en la IO-1 Toma de muestras biológicas (muestras de sangre periférica).

De acuerdo a lo especificado en el punto 3.2.3 para muestras de medula ósea de la IO-3 Cariotipo.

4.0 REACTIVOS

4.1 MATERIALES

- Porta objetos con pantalla esmerilada
- Vasos koplín de 20 ml
- Vaso koplín de 50 ml
- Probetas de 50 ml

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	5. Instrucción Operativa para Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes "FISH"		HOJA: 5 DE: 12

- Cubreobjetos
- Aplicador de madera
- Cemento iris
- Agua destilada
- NP-40
- Sonda LSI (Secuencia específica)
- Sonda WCP (Pintan todo el cromosoma)
- Sonda CEP (Pintan centrómero)
- DAPI

4.2 PREPARACIÓN

- Solución SSC 2 X: 17.53 g de cloruro de sodio y 8.82g de citrato de sodio en 1000 mL de agua destilada.
- Solución de etanol al 70 %
- Solución de etanol al 85 %
- Solución de etanol al 100 %
- Solución de lavado 1: SSC 0.4 X/0.3% de NP-40
- Solución de lavado 2: SSC 2 X/0.1% de NP-40

4.3 ACEPTABILIDAD

No Aplica.

4.4 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- a) Sondas FISH, Nonidet NP-40 y DAPI se almacenan a 20 °C.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	5. Instrucción Operativa para Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes "FISH"		HOJA: 6 DE: 12

b) Otros reactivos almacenar a temperatura ambiente.

5.0 CALIBRACIÓN

5.1 IDENTIFICACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.2 PREPARACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.3 PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

5.4 ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y FRECUENCIA DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

6.0 CONTROL DE CALIDAD

6.1 IDENTIFICACIÓN DE CONTROLES

No Aplica.

6.2 PREPARACIÓN DEL CONTROL

No Aplica.

6.3 FRECUENCIA DE USO DE CONTROLES

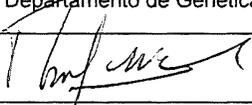
No Aplica.

6.4 ALMACENAMIENTO

No Aplica.

6.5 PROCEDIMIENTO DEL USO DE LOS CONTROLES

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	5. Instrucción Operativa para Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes "FISH"		HOJA: 7 DE: 12

6.6 LÍMITES DE ACEPTABILIDAD Y ACCIONES CORRECTIVAS

No Aplica.

6.7 REGISTRO Y ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS DE CONTROL DE CALIDAD

No Aplica.

6.8 EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD

No Aplica.

6.9 ALTERNATIVAS EN AUSENCIA DE CONTROLES

Seleccionar aleatoriamente una muestra de médula ósea o sangre periférica.

La Química y/o el Químico del área realiza el estudio de rutina de FISH del botón de la muestra, en paralelo con muestras positiva y negativa para la sonda seleccionada (controles internos del proceso) de acuerdo a lo descrito en el procedimiento del ensayo.

Elaborar reporte de resultado que incluya los hallazgos observados, de acuerdo a la nomenclatura del Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN), número de metafases o núcleos en interfase analizados de la muestra problema y controles.

Determinar la concordancia de los resultados entre los analistas para la muestra problema y la concordancia de los resultados de las muestras control.

7.0 EQUIPO NECESARIO

- Guantes desechables
- Gradillas
- Incubadora
- Baño maria
- Microscopio óptico
- Microfuga

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	5. Instrucción Operativa para Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes "FISH"		HOJA: 8 DE: 12

- Micropipetas de 10, 100 y 200 µL
- Estación citogenética
- Hibridador
- Cronómetro
- Pinzas
- Refrigerador y congelador

8.0 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Siembra y Cosecha

1. De acuerdo a lo especificado en el punto 8.0 de la IO-4 Cariotipo para muestras de Médula Ósea y Sangre Periférica.

Hibridación in situ.

1. Evaluar la calidad de la preparación observándola en un microscopio de contraste de fases.
2. Madurar las laminillas a temperatura ambiente por 24 horas.
3. Seleccionar un área de 22x22 mm y marcar con un lápiz diamante.
4. Realizar lavado con solución SSC 2X a 37°C por 5 minutos.
5. Deshidratar laminilla (s) en serie de soluciones de etanol al 70, 85 y 100 % a temperatura ambiente por 2 minutos cada uno.
6. Dejar secar la laminilla (s) o mantener en etanol al 100 % hasta que se prepara la mezcla de la sonda.
7. Descongelar sonda y tampón correspondiente.

Preparar mezcla de sonda

1. Mezclar en vortex los tubos del kit de la sonda a emplear por 3 segundos y centrifugar en microfuga 15 segundos.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	5. Instrucción Operativa para Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes "FISH"		HOJA: 9 DE: 12

2. Adicionar en un tubo eppendor de 0.6 ml, 7 μ L de buffer de hibridación, 1 μ L de sonda WCP o LSI y 2 μ L de agua destilada.
3. Mezclar en vortex y volver a centrifugar 15 segundos.
4. Aplicar la sonda en el área marcada para hibridar.
5. Colocar el cubreobjetos, eliminar burbujas y sellar con cemento iris.
6. Colocar la laminilla en equipo de hibridación y correr programa de acuerdo al tipo de sonda utilizada:
7. Retirar el pegamento y el cubreobjeto de la laminilla.
8. Sumergir la laminilla en la solución de lavado 1 a 73 °C por 2 minutos.
9. Sumergir la laminilla en la solución de lavado 2 a temperatura ambiente, agitar de 1 a 3 segundos y dejar 1 minuto en la solución.
10. Secar la laminilla a temperatura ambiente protegida de la luz.
11. Aplicar 10 uL de DAPI en el área marcada, sellar con cemento iris y secar a temperatura ambiente.
12. Analizar la (s) laminilla (s) y documentar las imágenes en la estación citogenética.
13. Determinar que los patrones de hibridación de las muestras cumplan con las especificaciones técnicas de las sondas comerciales utilizadas para su interpretación.
14. La laminilla se analiza en forma convencional comenzando desde el borde derecho avanzando hacia la izquierda con el objetivo 20 X, cuando se localice una metafase o el área a analizar se adiciona una gota de aceite de inmersión y se observa con el objetivo de 100X. Se descartan las metafases incompletas y los núcleos en interfase solapados.

Muestras de médula ósea

1. Se analizan todas las metafases que se encuentren en el área marcada, si el material es escaso se analizan 200 a 500 núcleos en interfase si se sospecha de mosaico de baja proporción.

Muestras de sangre periférica

1. Se analizan 15 metafases.
2. Almacenar las laminillas hibridadas a -20 °C protegidas de la luz.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	5. Instrucción Operativa para Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes "FISH"		HOJA: 10 DE: 12

9.0 RESULTADOS

9.1 CÁLCULOS Y CONVERSIONES

No Aplica.

9.2 UNIDADES Y REDONDEO DE NÚMEROS

No Aplica.

9.3 REPORTE DE RESULTADOS

1. Elaborar informe de resultados de acuerdo a lo establecido en formato 9.2 Procedimiento para realizar estudios especializados en Citogenética y Biología molecular, Manual de Procedimientos del Departamento de Genética).

9.4 INTERVALOS DE REFERENCIA

No Aplica.

9.5 LINEALIDAD E INTERVALO REPORTABLE

No Aplica.

9.5 CRITERIOS DE REPETICIÓN

El análisis se repite cuando no se obtiene señal fluorescente que permita un análisis confiable, cuando el material resulta insuficiente o se requiere ampliar el número de células analizadas.

9.7 VALORES CRÍTICOS

No Aplica.

10.0 INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES DEL METODO

1. Son causa de interferencia preparaciones con citoplasma, ya que no permite la interacción de la sonda con el DNA blanco.
 - a) No detecta alteraciones estructurales.
 - b) No detecta alteraciones numéricas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	5. Instrucción Operativa para Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes "FISH"		HOJA: 11 DE: 12

11.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 11.1 Ácidos nucleicos:** Moléculas portadoras de información celular que determinan las características hereditarias de todos los seres vivos.
- 11.2 Aneuploidías:** Cualquier número de cromosomas que no es múltiplo exacto del número haploide normal (23) de un individuo.
- 11.3 Centroméricas:** Es la zona más angosta de los cromosomas y tiene un papel clave en la división celular.
- 11.4 Citogenética:** Rama de la Genética que estudia el material hereditario dentro de la célula.
- 11.5 Epifluorescencia:** La fluorescencia acoplada a un microscopio electrónico convencional.
- 11.6 Hibridación *in situ* Fluorescente o FISH:** Técnica citogenética de marcaje de cromosomas o núcleos en interfase mediante la cual estos son hibridados con sondas que emiten fluorescencia y permiten la visualización, distinción y estudio.
- 11.7 Microdelección:** Pérdida de material cromosómico, entre 1 a 3 millones de pares de bases de DNA, las cuales no pueden ser detectadas por un cariotipo convencional.
- 11.8 Procesos Mieloproliferativos:** Grupo de enfermedades por las que la médula ósea elabora demasiados glóbulos rojos, glóbulos blancos o plaquetas.
- 11.9 Mosaicismo:** El término se utiliza para describir la presencia de más de un tipo de célula en una persona.
- 11.10 Translocaciones:** Cambios genéticos en el que un trozo de un cromosoma o de varios cromosomas se rompen y se une a otro (s) cromosoma(s).

12.0 FORMATOS, REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

Dracopoli NC, haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR. Current protocols in human genetics. John Wiley and Sons, Inc, USA, 1994.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	5. Instrucción Operativa para Hibridación In Situ con Sondas Fluorescentes "FISH"		HOJA: 12 DE: 12

Rooney DE and Czepulkowski BH. Human cytogenetics: apractical approach. Volumen II, 2a. edición. Oxford university press, New York, USA, 1992.

Insertos de las sondas utilizadas.

13.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Versión	Fecha	Propósito de la Revisión	Realizado por

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

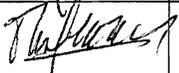
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	6. Instrucción Operativa para Reacción en Cadena de la Polimerasa		HOJA: 1 DE: 10

6. INSTRUCCIÓN OPERATIVA PARA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

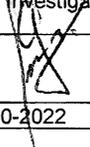
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	6. Instrucción Operativa para Reacción en Cadena de la Polimerasa		HOJA: 2 DE: 10

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	
Clave: IO-GEN-06	Versión: 0

	Nombre	Cargo	Firma	Fecha
Elaboró	Q.F.B. MARÍA A. LÓPEZ HERNÁNDEZ	JEFA DE LABORATORIO		07-10-2022
Revisó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022
Aprobó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022

Revisión Bi-Anual <i>La firma indica que el procedimiento se mantiene SIN modificaciones</i>		
Nombre	Firma	Fecha

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	6. Instrucción Operativa para Reacción en Cadena de la Polimerasa		HOJA: 3 DE: 10

1.0 RESPONSABILIDADES

La Jefa de Laboratorio, Químicas y/o los Químicos cumplen con lo descrito en este procedimiento.

2.0 PRINCIPIO

Reacción

La PCR de punto final se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas de replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente. El proceso de la PCR se realiza en un termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria en cada etapa de la reacción.

Aplicación Clínica

Esta técnica permite entre otras cosas la identificación de enfermedades hereditarias, cada gen de interés puede ser amplificado de forma individual utilizando oligonucleótidos específicos; los productos obtenidos se someten posteriormente a otras técnicas moleculares como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) o Secuenciación con la finalidad de poder identificar si el individuo en estudio porta alguna mutación que explique la presencia de la enfermedad y determinar si existen portadores en la familia.

3.0 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

3.1 PREPARACIÓN DE LA PERSONA BENEFICIARIA

No Aplica.

3.2 TIPO DE MUESTRA

3.2.1 Tipo de muestra:

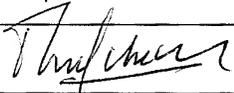
ADN genómico purificado y cuantificado (véase en IO Extracción de ácidos nucleicos).

3.2.2 Volumen requerido

5 ul de ADN genómico véase en IO Extracción de ácidos nucleicos).

3.2.3 Recipiente de recolección

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	6. Instrucción Operativa para Reacción en Cadena de la Polimerasa		HOJA: 5 DE: 10

4.2.1 Solución de ADN genómico a 100 ng/ul

Preparar dilución de trabajo de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$V1C1=V2C2$$

Donde:

V1= Volumen inicial.
C1= Concentración inicial
V2= Volúmen final
C2= Concentración final

Despejando V1 tenemos: $V1= V2C2 / C1$

4.2.2 Oligonucleótidos stock de trabajo

Se preparan 50 µl de solución de trabajo 10 mm de ambos oligonucleótidos (sentido y antisentido) con agua bidestilada estéril.

4.2.3 Mezcla de reacción de amplificación

REACTIVO	Cantidad 1 REACCIÓN
Mezcla maestra de PCR (comercial)	25.0 µl
Oligonucleótido sentido 10uM	2.0 µl
Oligonucleótido antisentido 10 uM	2.0 µl
Agua	19.0 µl
Volumen total	48.0 µl

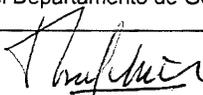
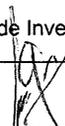
Nota: los volúmenes de la Mezcla maestra de PCR utilizados en la reacción de PCR pueden variar de acuerdo al fabricante, así como el volumen final de agua.

4.3 ACEPTABILIDAD

Determinada por la fecha de caducidad en reactivos.

4.4 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	6. Instrucción Operativa para Reacción en Cadena de la Polimerasa		HOJA: 6 DE: 10

5.0 CALIBRACIÓN

5.1 IDENTIFICACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.2 PREPARACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.3 PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

5.4 ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y FRECUENCIA DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

6.0 CONTROL DE CALIDAD

6.1 IDENTIFICACIÓN DE CONTROLES

No Aplica.

6.2 PREPARACIÓN DEL CONTROL

No Aplica.

6.3 FRECUENCIA DE USO DE CONTROLES

No Aplica.

6.4 ALMACENAMIENTO

No Aplica.

6.5 PROCEDIMIENTO DEL USO DE LOS CONTROLES

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	6. Instrucción Operativa para Reacción en Cadena de la Polimerasa		HOJA: 7 DE: 10

6.6 LÍMITES DE ACEPTABILIDAD Y ACCIONES CORRECTIVAS

No Aplica.

6.7 REGISTRO Y ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS DE CONTROL DE CALIDAD

No Aplica.

6.8 EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD

No Aplica.

6.9 ALTERNATIVAS EN AUSENCIA DE CONTROLES

Como control interno del proceso se incluye un control negativo (tubo extra al que se le agreguen todos los reactivos utilizados en el PCR, excepto ADN).

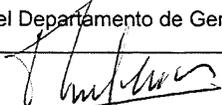
Amplificación positiva del control negativo indica contaminación con ADN de algún reactivo, por lo cual se repite el ensayo.

7.0 EQUIPO NECESARIO

- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Refrigerador y congelador
- Termociclador de Punto Final:

FASE	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización	95 °C	5-15 minutos *
35-40 ciclos	95 °C	1 minuto
	48-68 °C	30 segundos a 1 minuto**
	68-72 °C	1 minuto/ kb
Extensión final	72 °C	5 - 10 minutos
Mantener	4 °C	∞

Tabla 1. Condiciones de amplificación para una reacción de PCR convencional.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	6. Instrucción Operativa para Reacción en Cadena de la Polimerasa		HOJA: 8 DE: 10

Nota:

*De acuerdo a las especificaciones del fabricante de la mezcla maestra de PCR.

**Dependiendo de las temperaturas de fusión (Tm) de los oligonucleótidos utilizados.

8.0 PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO

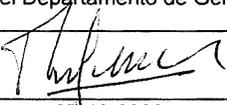
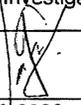
La Jefa de Laboratorio, la Química y/o el Químico son responsables de:

1. Rotular tiras de tubos de PCR.
2. Descongelar y mantener en hielo la mezcla maestra de reacción de PCR.
3. Descongelar la sonda Taqman y mantener en hielo protegida de la luz.
4. Preparar la mezcla de reacción para el número total de muestras a procesar, de acuerdo a la tabla del punto 4.2.3 y mantener en hielo.
5. Alicuotar la mezcla de reacción en los tubos de tiras de PCR.
6. Adicionar 100ng de muestra de ADN de acuerdo al punto 4.2.1, excepto al tubo del control negativo.
7. Tapar herméticamente las tiras de PCR.
8. Encender el Termociclador de punto final y programar protocolo de amplificación de acuerdo al punto 7 tabla1.
9. Colocar muestras en el equipo e iniciar corrida.
10. Analizar los productos de amplificado en un gel de agarosa al 1.5 % (véase en IO-3 Electroforesis en gel de agarosa).
11. Almacenar los productos de amplificado a -20°C hasta su utilización en estudios posteriores.

9.0 RESULTADO

9.1 CÁLCULOS Y CONVERSIONES

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	6. Instrucción Operativa para Reacción en Cadena de la Polimerasa		HOJA: 9 DE: 10

9.2 UNIDADES Y REDONDEO DE NÚMEROS

No Aplica.

9.3 REPORTE DE RESULTADOS

No Aplica.

9.4 INTERVALOS DE REFERENCIA

No Aplica.

9.5 LINEALIDAD E INTERVALO REPORTABLE

No Aplica.

9.6 CRITERIOS DE REPETICIÓN

El análisis se repite cuando no hay producto de amplificado, se obtienen productos adicionales al fragmento esperado o amplifica el control negativo.

9.7 VALORES CRÍTICOS

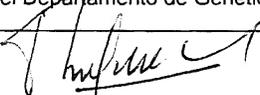
No Aplica.

10.0 INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES DEL METODO

1. La cantidad final de producto amplificado puede verse afectada por inhibidores, saturación de la reacción o bien por falta de una estandarización adecuada.

11.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 11.1 ADN genómico:** ADN que está dentro del núcleo de las células.
- 11.2 Oligonucleótidos:** Segmentos cortos de ácidos nucleicos sintetizados artificialmente que son utilizados como cebadores en las reacciones de PCR y como sondas.
- 11.3 PCR:** Siglas utilizadas para referirse a la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	6. Instrucción Operativa para Reacción en Cadena de la Polimerasa		HOJA: 10 DE: 10

11.4 Polimerasa: Son polimerasas de ADN, que provienen de organismos termófilos (resistentes al calor) como las bacterias.

12.0 FORMATOS, REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

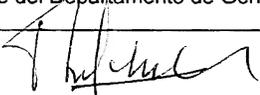
Sambrook, J., Russel, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3a ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hengen PN. Optimizing multiplex and LA-PCR with betaine. Trends Biochem Sci. 1997 Jun;22(6):225–226

Sun, Y., Hegamyer, G. and Colburn, N. (1993). PCR-direct sequencing of a GC-rich region by inclusion of 10% DMSO: application to mouse c-jun. Biotechniques. 15, 372-374.

13.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Versión	Fecha	Propósito de la Revisión	Realizado por

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

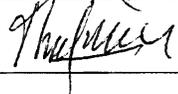
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	7. Instrucción Operativa para Discriminación Alélica con Sondas TAQMAN		HOJA: 1 DE: 24

7. INSTRUCCIÓN OPERATIVA PARA DISCRIMINACIÓN ALÉLICA CON SONDAS TAQMAN

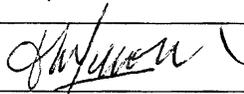
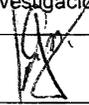
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	7. Instrucción Operativa para Discriminación Alélica con Sondas TAQMAN		HOJA: 2 DE: 24

DISCRIMINACIÓN ALÉLICA CON SONDAS TAQMAN MUTACIÓN C677T DEL GEN MTHFR GENOTIPIFICACIÓN DE HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA Clave: IO-GEN-07 Versión: 0

	Nombre	Cargo	Firma	Fecha
Elaboró	Q.F.B. MARÍA A. LÓPEZ HERNÁNDEZ	JEFA DE LABORATORIO		07-10-2022
Revisó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022
Aprobó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022

Revisión Bi-Anual		
<i>La firma indica que el procedimiento se mantiene SIN modificaciones</i>		
Nombre	Firma	Fecha

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	7. Instrucción Operativa para Discriminación Alélica con Sondas TAQMAN		HOJA: 3 DE: 24

1.0 RESPONSABILIDADES

La Jefa de Laboratorio y la Química y/o el Químico Investigador cumplen con lo descrito en este procedimiento.

2.0 PRINCIPIO

Reacción

La genotipificación de SNP por sondas TaqMan utiliza sondas (secuencia normal y secuencia mutada) complementarias a la secuencia de interés amplificada por un par de oligonucleótidos específicos, fluorocromos en el extremo 5' y un apagador en el extremo 3'. Durante la fase de extensión de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se rompe la sonda hibridada con el DNA, separando el fluorocromo del apagador, detectando la emisión de fluorescencia de una o ambas sondas dependiendo del genotipo de cada individuo.

Aplicación clínica

La proteína codificada por el gen *MTHFR* desempeña un papel importante en la regulación del metabolismo de los folatos, homocisteína y metionina. La variante C677T del gen *MTHFR* es la responsable del defecto hereditario más común en el metabolismo de los folatos.

Los individuos homocigotos para la mutación (TT) codifican para una enzima termolábil con actividad < 40 % condicionando disminución de folatos y aumento de Hcy plasmática, siendo esto un factor de para diversas enfermedades comunes del adulto, pérdidas gestacionales y ciertos tipos de cáncer.

La hemocromatosis hereditaria (HH) es un trastorno hereditario autosómico recesivo del metabolismo del hierro. Se han descrito un número de diferentes mutaciones *HFE* hasta el momento. Entre las mutaciones más frecuentes se encuentra la C282Y, en la cual existe un cambio de aminoácido en la posición 282 de cisteína a tirosina y la mutación H63D, donde el amino ácido histidina se sustituye por un ácido aspártico en la posición 63 H63D. La contribución de este alelo para la sobrecarga de hierro es más relevante en el caso de heterocigosidad combinada con el alelo C282Y (C282Y/H63D).

3.0 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

3.1 PREPARACIÓN DE LA PERSONA BENEFICIARIA

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	7. Instrucción Operativa para Discriminación Alélica con Sondas TAQMAN		HOJA: 4 DE: 24

3.2 TIPO DE MUESTRA

ADN genómico purificado y cuantificado (Véase en IO-2 Extracción de ácidos nucleicos).

3.3 CONDICIONES DE LA MUESTRA

Volumen requerido

5 ul de ADN genómico concentrado (Véase en IO-2 Extracción de ácidos nucleicos).

3.3.1 Recipiente de recolección:

No Aplica.

3.3.2 Identificación de la muestra:

Véase en punto 3.3.2 de la IO-1 Toma de muestras biológicas.

3.3.3 Factores de rechazo:

Incumplimiento de los criterios establecidos en el punto 9.4 de la IO Extracción de ácidos nucleicos.

3.4 CONDICIONES DE MANEJO Y ALMACENAMIENTO

El ADN se mantiene a -20 °C hasta su utilización.

4.0 REACTIVOS

4.1 MATERIALES

- Tiras de tubos de PCR para termocicladores de tiempo real.
- Tapas planas para tubos de PCR para termocicladores de tiempo real.
- Tubos eppendorf de 600 ul.
- Bloque de enfriamiento.
- Puntas para micropipeta de 100 ul.
- Puntas para micropipeta de 10 ul.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	7. Instrucción Operativa para Discriminación Alélica con Sondas TAQMAN		HOJA: 5 DE: 24

- Micropipetas de volumen variable: 20 a 100 ul.
 a 10 ul.
- Mezcla de Genotipificación de Sondas Taqman.
- Agua inyectable
- Sonda Taqman

MUTACIÓN C677T DEL GEN MTHFR

- *MTHFR-C677T (rs1801133)*
- Secuencia: GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG [G/A] CTCCCGCAGACACCTTCTCCTTCAA
 ch. 1: 11796321 GRCh38

GENOTIPIFICACIÓN DE HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA

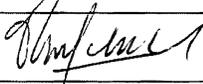
- *HFE-C282Y (rs1800562)*
- Secuencia: CCTGGGGAAGAGCAGAGATATACGT [G/A] CCAGGTGGAGCACCCAGGCCTGGAT
 ch. 6: 26092913 GRCh38
- *HFE-H63D (rs 1799945)*
- Secuencia: TGACCAGCTGTTTCGTGTTCTATGAT [C/G] ATGAGAGTCGCCGTGTGGAGCCCCG
 ch. 6: 26090951 GRCh38

4.2 PREPARACIÓN

4.2.1 Solución de ADN genómico a 35 ng/ul

Preparar dilución de trabajo de acuerdo a la fórmula siguiente:

V1C1=V2C2 DONDE:	V1= VOLUMEN INICIAL
	C1= Concentración inicial
	V2= Volúmen final
	C2= Concentració final
Despejando V1 tenemos:	V1= V2C2 / C1

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	7. Instrucción Operativa para Discriminación Alélica con Sondas TAQMAN		HOJA: 6 DE: 24

4.2.2 Mezcla de reacción de Sonda Taqman

REACTIVO	CANTIDAD 1 reacción
Mezcla de genotipificación	5.0 µl
Agua libre de DNAsas	2.875 µl
Sonda Taqman	0.125 µl
Volúmen total	8 µl

4.3 ACEPTABILIDAD

Determinada por la vigencia de la fecha de caducidad de los reactivos.

4.4 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

ADN, Mezcla de genotipificación, Sondas Taqman se almacenan a -20 °C.

5.0 CALIBRACIÓN

5.1 IDENTIFICACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.2 PREPARACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.3 PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

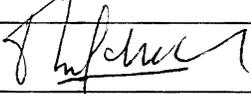
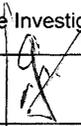
5.4 ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y FRECUENCIA DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

6.0 CONTROL DE CALIDAD

6.1 IDENTIFICACIÓN DE CONTROLES

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	7. Instrucción Operativa para Discriminación Alélica con Sondas TAQMAN		HOJA: 7 DE: 24

6.2 PREPARACIÓN DEL CONTROL

No Aplica.

6.3 FRECUENCIA DE USO DE CONTROLES

No Aplica.

6.4 ALMACENAMIENTO

No Aplica.

6.5 PROCEDIMIENTO DEL USO DE LOS CONTROLES

No Aplica.

6.6 LÍMITES DE ACEPTABILIDAD Y ACCIONES CORRECTIVAS

No Aplica.

6.7 REGISTRO Y ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS DE CONTROL DE CALIDAD

No Aplica.

6.8 EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD

No Aplica.

6.9 ALTERNATIVAS EN AUSENCIA DE CONTROLES

Como control interno del proceso se incluye un control negativo (tubo extra al que se le agreguen todos los reactivos utilizados en el PCR, excepto ADN).

Amplificación positiva del control negativo indica contaminación con ADN de algún reactivo, por lo cual se repite el ensayo.

7.0 EQUIPO NECESARIO

- Termociclador de Tiempo Real.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	7. Instrucción Operativa para Discriminación Alélica con Sondas TAQMAN		HOJA: 8 DE: 24

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA UNA REACCIÓN CONVENCIONAL CON SONDAS TAQMAN

- 1 ciclo 95 °C por 10 minutos.
- 40 ciclos 92 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto.
- 1 ciclo 4 °C.

8.0 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

La Jefa de Laboratorio, la Química y/o el Químico Investigador son responsables de:

1. Alicuotar por duplicado 2 µL de ADN a 35ng/ µl (punto 4.2.1) de muestra problema y controles de genotipo conocidos (silvestre, heterocigoto, mutado), en tiras de PCR rotuladas, esperar a que se evapore la muestra.
2. Descongelar la mezcla maestra de reacción de sonda Taqman y colocar en hielo.
3. Descongelar la sonda Taqman y mantener en hielo protegida de la luz.
4. Rotular tira de pozos.
5. Preparar la mezcla de reacción para el número total de muestras a procesar (véase en punto 4.2.2) incluyendo un control negativo y mantener en hielo.
6. Mezclar los reactivos 4 veces por pipeteo.
7. Alicuotar 8 µL de la mezcla de reacción en tubos de tiras de PCR.
8. Tapar herméticamente las tiras de PCR.
9. Encender el equipo de Tiempo Real.
10. Abrir programa y seleccionar la aplicación Discriminación Alélica.
11. Programar tipo de muestra y condiciones de PCR:
 - a) Colocar muestras en el equipo e iniciar corrida.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	7. Instrucción Operativa para Discriminación Alélica con Sondas TAQMAN		HOJA: 9 DE: 24

- b) Analizar los genotipos mediante las gráficas de amplificación generadas para cada sonda alelo específica o utilizando el módulo de análisis de discriminación alélica disponible en el Software del Termociclador de Tiempo Real.

9.0 RESULTADOS

9.1 CÁLCULOS Y CONVERSIONES

No Aplica.

9.2 UNIDADES Y REDONDEO DE NÚMEROS

No Aplica.

9.3 REPORTE DE RESULTADOS

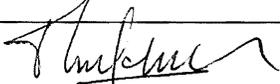
- a) MUTACIÓN C677T DEL GEN MTHFR
b) GENOTIPIFICACIÓN DE HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA

Elaborar informe de resultados de acuerdo a lo establecido en formato 9.3 (Procedimientos para realizar estudios especializados de Citogenética y Biología Molecular, Manual de Procedimientos del Departamento de Genética).

9.4 INTERVALOS DE REFERENCIA

- a) MUTACIÓN C677T DEL GEN MTHFR
b) GENOTIPIFICACIÓN DE HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA

FLUORESCENCIA DETECTADA	(TIPO) GENOTIPO	LOCALIZACIÓN (FLUORÓCROMO INCORPORADO A LA SONDA)
VIC(Roja)	Homocigoto silvestre	Esquina inferior derecha
FAM (Azul)	Homocigoto mutante	Esquina superior izquierda

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	7. Instrucción Operativa para Discriminación Alélica con Sondas TAQMAN		HOJA: 10 DE: 24

Ambas (Verde)	Heterocigoto	Esquina superior derecha
	Control negativo (sin muestra)	Esquina inferior izquierda

Correlación sonda/secuencia en la grafica de Discriminación Alélica.

9.5 LINEALIDAD E INTERVALO REPORTABLE

No Aplica.

9.6 CRITERIOS DE REPETICIÓN

Quando no es posible discriminar genotipos mediante las curvas de amplificación o en los graficos de discriminación alélica.

9.7 VALORES CRÍTICOS

No Aplica.

10.0 INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES DEL METODO

La pérdida de fluorescencia de las sondas, disminuye la especificidad y eficiencia del ensayo.

11.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 11.1 Alélica:** La discriminación alélica es el proceso por el cual se detectan alelos específicos de la secuencia de un nucleótido (SNPs: polimorfismos de Nucleótido Único) en muestras de ADN genómico utilizando Termocicladores de tiempo real. Relacionado con alelo (s), que son las formas alternativas de un gen.
- 11.2 Enzima:** Proteínas complejas que producen un cambio químico específico en todas las partes del cuerpo.
- 11.3 Fluorocromos:** Componente (s) de una molécula que hace que ésta sea fluorescente
- 11.4 Folatos:** Es una vitamina B que se encuentra naturalmente en los alimentos, como hortalizas de hojas verdes, frutas cítricas y frijoles

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	7. Instrucción Operativa para Discriminación Alélica con Sondas TAQMAN		HOJA: 11 DE: 24

- 11.5 Hemocromatosis:** Enfermedad hereditaria del metabolismo del hierro.
- 11.6 Heterocigosidad:** Frecuencia de heterocigotos para un locus específico.
- 11.7 Homocisteína:** Es una sustancia química que el cuerpo utiliza para producir proteínas, se sintetiza a partir de metionina.
- 11.8 Metionina:** Aminoácido esencial que ayuda a la síntesis de proteínas.
- 11.9 Nucleótido:** Unidad fundamental de ácidos nucleicos.
- 11.10 Oligonucleótidos:** Segmento corto de ácidos nucleicos sintetizado artificialmente utilizado como cebador en la reacción de PCR y como sondas.
- 11.11 Termocicladores** Aparatos usados en Biología Molecular que permiten realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de diversas hebras de ADN en la técnica de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) o para reacciones de secuencia con el método de Sanger.

12.0 FORMATOS Y REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

D.K. Walburger. An improved real time PCR method for simultaneous detection of C282Y and H63Y mutations in the HFE gene associated with hereditary hemochromatosis. Mutation Research Genomics, 432 (2001), 69-78.

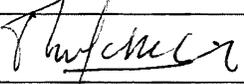
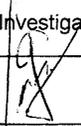
13.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Versión	Fecha	Propósito de la Revisión	Realizado por

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	8. Instrucción Operativa para Secuenciación Sanger de ADN		HOJA: 1 DE: 12

8. INSTRUCCIÓN OPERATIVA PARA SECUENCIACIÓN SANGER DE ADN

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

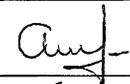
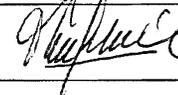
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 <small>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN</small>	CÓDIGO: M.T./0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	8. Instrucción Operativa para Secuenciación Sanger de ADN		HOJA: 2 DE: 12

SECUENCIACIÓN SANGER DE ADN

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE VON HIPPEL LINDAU
 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE Distrofia Muscular Oculofaríngea
 RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (CAG Y GGC)
 BÚSQUEDA DE MUTACIÓN DIRIGIDA
 SECUENCIACIÓN DEL GEN SRY
 MUTACIÓN MELAS A3243G

Clave: IO-GEN-08

Versión: 0

	Nombre	Cargo	Firma	Fecha
Elaboró	Q.F.B. MARÍA A. LÓPEZ HERNÁNDEZ	JEFA DE LABORATORIO		07-10-2022
Revisó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022
Aprobó	DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ	JEFE DEL DEPARTAMENTO		07-10-2022

Revisión Bi-Anual

La firma indica que el procedimiento se mantiene SIN modificaciones

Nombre	Firma	Fecha

CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	8. Instrucción Operativa para Secuenciación Sanger de ADN		HOJA: 3 DE: 12

1.0 RESPONSABILIDADES

La Jefa de Laboratorio y las Químicas y/o los Químicos cumplen con lo descrito en este procedimiento.

2.0 PRINCIPIOS

Reacción

La secuenciación de Sanger se basa en la polimerización del ADN y el uso de dideoxinucleótidos marcados que se incorporan a una copia creciente de la secuencia de ADN. La reacción genera múltiples copias de la plantilla de ADN, todas de diferentes longitudes marcadas con fluorescencia y que pueden separarse por tamaño mediante electroforesis capilar evidenciando exactamente qué base está en cada posición a lo largo de la secuencia de ADN.

Aplicación Clínica

Se refiere a la búsqueda directa de una mutación conocida sin investigar el resto de la secuencia del gen. La información obtenida por este método se limita únicamente a una sola mutación o a un grupo de mutaciones mediante Secuenciación Sanger.

La Secuenciación Sanger permite identificar mutaciones en línea germinal en genes causales de enfermedades monogénicas, enfermedades causadas por expansión en el número de repetidos o realizar la búsqueda directa de una mutación conocida sin investigar el resto de la secuencia del gen de interés. Representa una importante y valiosa herramienta diagnóstica que permite además identificar portadores en riesgo en familias con el propósito de brindarles asesoramiento genético.

3.0 RECOLECCIÓN DE MUESTRA

3.1 PREPARACIÓN DE LA PERSONA BENEFICIARIA

No Aplica.

3.2 TIPO DE MUESTRA

Producto de PCR (véase IO-6 Reacción en Cadena de la Polimerasa).

3.3 CONDICIONES DE LA MUESTRA

Volumen requerido.

5 a 10 ul de producto de PCR purificado.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	8. Instrucción Operativa para Secuenciación Sanger de ADN		HOJA: 5 DE: 12

- Septas para placas de 96 pozos.
- Base para placas de 96 pozos.

4.2 PREPARACIÓN

- Big dye terminator.
- Buffer 2.5 X para big dye.
- Agua grado biología molecular.
- Templado de DNA.
- Formamida.
- Polímero de electroforesis capilar para el Analizador Genético (de acuerdo a lo especificado por el fabricante).

4.2.1 Oligonucleotidos stock de trabajo

Se preparan 50 µl de solución de trabajo 10 mM de ambos oligonucleótidos (sentido y antisentido) con agua bidestilada estéril.

4.2.2 Mezcla de reacción de Secuencia

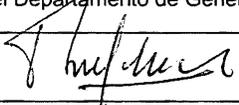
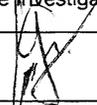
REACTIVOS	1 RXN
BigDye™ Terminator 3.1 Reaction Mix	6 µL
Oligonucleótido sentido (o antisentido), 3.2 µM	4 µL
Amplificado purificado	10 µL

4.3 ACEPTABILIDAD

Determinada por la presentación de la fecha de caducidad y de los insertos con las especificaciones.

4.4 ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y FRECUENCIA DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	8. Instrucción Operativa para Secuenciación Sanger de ADN		HOJA: 6 DE: 12

5.0 CALIBRACIÓN

5.1 IDENTIFICACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.2 PREPARACIÓN DEL CALIBRADOR

No Aplica.

5.3 PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

5.4 ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y FRECUENCIA DE CALIBRACIÓN

No Aplica.

6.0 CONTROL DE CALIDAD

6.1 IDENTIFICACIÓN DE CONTROLES

No Aplica.

6.2 PREPARACIÓN DEL CONTROL

No Aplica.

6.3 FRECUENCIA DE USO DE CONTROLES

No Aplica.

6.4 ALMACENAMIENTO

No Aplica.

6.5 PROCEDIMIENTO DEL USO DE LOS CONTROLES

No Aplica.

6.6 LÍMITES DE ACEPTABILIDAD Y ACCIONES CORRECTIVAS

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	8. Instrucción Operativa para Secuenciación Sanger de ADN		HOJA: 7 DE: 12

No Aplica.

6.7 REGISTRO Y ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS DE CONTROL DE CALIDAD

No Aplica.

6.8 EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD

No Aplica.

6.9 ALTERNATIVAS EN AUSENCIA DE CONTROLES

Procesar en paralelo con la muestra problema una reacción de secuencia utilizando el oligonucleótido y el ADN molde incluidos en el kit.

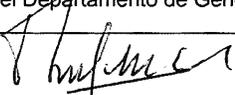
Los resultados permiten determinar si la reacción de secuencia falló por mala calidad de las muestras o el instrumento presenta fallas en su funcionamiento.

7.0 EQUIPO NECESARIO

- Cámara de electroforesis.
- Fuente de poder.
- Refrigerador y congelador.
- Termociclador de punto final.
- Analizador genético de Electroforesis Capilar y software de análisis de secuencias.

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA UNA REACCIÓN DE SECUENCIA CONVENCIONAL

- 96 °C por 10 segundos.
- 50 °C por 5 segundos.
- 60 °C por 4 minutos.
- Repetir del paso 1 al 3 por 25 ciclos.
- Mantener a 4 °C 4 indefinidamente y en oscuridad.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	8. Instrucción Operativa para Secuenciación Sanger de ADN		HOJA: 8 DE: 12

8.0 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

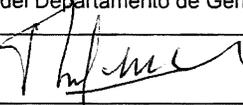
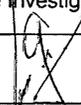
La Jefa de Laboratorio, la Química y/o el Químico son responsables de:

Purificación de productos de PCR por columna

1. Preparar la columna de purificación de acuerdo a la ficha técnica del fabricante.
2. Agregar 5 volúmenes de solución de unión a la membrana comercial por 1 volumen de la reacción producto de PCR.
3. Poner la mezcla anterior en la columna, centrifugar (de acuerdo a las indicaciones del fabricante) descartar el eluido y regresar la columna al microtubo.
4. Adicionar solución de lavado, dejar reposar 2-5 minutos y centrifugar la columna.
5. Colocar la columna en un microtubo de 1.5 mL.
6. Eluir el DNA con 30 µL de H₂O libre de DNA.
7. Preparar gel de agarosa al 1.8 %. (véase en IO-4 Electroforésis en gel de agarosa).
8. Correr electroforesis de 5 µL del purificado con 3 uL de buffer de carga, incluir un pozo con 5ul del marcador de peso molecular de referencia.

Reacción de Secuencia

1. Identificar los reactivos y ponerlos a descongelar en hielo.
2. Preparar y rotular las tiras de tubos de 0.2 ml para PCR.
3. Homogeneizar los reactivos por vortexeo y concentrar el volumen por una breve centrifugación en la microfuga.
4. Preparar la mezcla de reacción de secuencia (véase en tabla punto 4.2.2) y alicuotar en los tubos de PCR.
5. Adicionar el producto de PCR purificado a cada uno de los microtubos correspondientes y homogeneizar por pipeteo.
6. Colocar las reacciones en el termociclador e iniciar el programa de Secuencia.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	8. Instrucción Operativa para Secuenciación Sanger de ADN		HOJA: 9 DE: 12

Purificación de la reacción de secuencia por columna

1. Colocar las columnas en un vortex para resuspender resina (de acuerdo a las recomendaciones del fabricante).
2. Colocar la columna en el tubo colector de 2 mL.
3. Centrifugar 5 minutos a 3500 rpm.
4. Pasar la columna a un microtubo limpio de 1.5 ml.
5. Centrifugar 5 minutos a 3500 rpm.
6. Colocar las muestras en un evaporador concéntrico durante 20 minutos, retirar y tapar los tubos.

Preparación de las muestras para Electroforesis Capilar

1. Adicionar 20 ul de formamida a cada tubo y resuspender con ayuda de micropipeta.
2. Desnaturalizar las muestras durante 5 minutos a 96 °C y enfriar inmediatamente a 4 °C.
3. Transferir la (s) muestras a la placa de secuenciación.
4. Verificar que el equipo tenga polímero y buffers en cantidad suficiente para la corrida.
5. Realizar electroforesis capilar en un analizador genético.
6. Obtener y analizar los electroferogramas de secuencia con la ayuda del software de análisis del analizador genético.

9.0 RESULTADOS

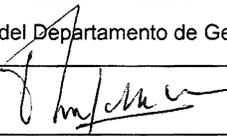
9.1 CÁLCULOS Y CONVERSIONES

No Aplica.

9.2 UNIDADES Y REDONDEO DE NÚMEROS

No Aplica.

9.3 REPORTE DE RESULTADOS

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	8. Instrucción Operativa para Secuenciación Sanger de ADN		HOJA: 10 DE: 12

- a) Elaborar informe de resultados de acuerdo a lo establecido en formato 9.3 (Procedimientos para realizar estudios especializados de Citogenética y Biología Molecular, Manual de Procedimientos del Departamento de Genética).

9.4 INTERVALOS DE REFERENCIA

- a) Interpretación de electroferogramas.

Un electroferograma es el gráfico que arroja el secuenciador después de analizar la electroforesis, proporciona información acerca de la calidad de la PCR y por ende la confiabilidad de los datos obtenidos.

- b) Comparación con la secuencia de referencia.

La secuencia de interés se compara con las secuencias de referencia disponibles en las diferentes bases de datos.

- c) Consenso

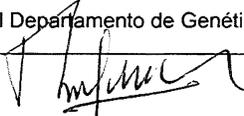
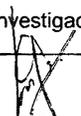
Analizar la reacción de secuencia sentido y antisentido para descartar falsos positivos en caso de identificar en los electroferogramas algún cambio en la secuencia de la muestra analizada.

- d) Linealidad e intervalo reportable

No Aplica.

9.6 CRITERIOS DE REPETICIÓN

- a) No se produce reacción de secuencia o esta decae poco después de comenzar.
- b) Señal de baja intensidad.
- c) El cromatograma es correcto, pero presenta mucho ruido de fondo.
- d) El cromatograma presenta secuencias superpuestas.
- e) La reacción comienza de forma normal, pero existe doble lectura a partir de un determinado punto.
- f) La secuencia pierde bruscamente la señal o decae progresivamente de forma temprana.
- g) Presencia de picos saturados y fuera de escala en el cromatograma.
- h) La secuencia es normal, pero aparece un pico de forma repentina.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	8. Instrucción Operativa para Secuenciación Sanger de ADN		HOJA: 11 DE: 12

i) Aparición de picos muy abiertos con la consecuente pérdida de resolución.

9.7 VALORES CRÍTICOS

No Aplica.

10.0 INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES DEL METODO

Electroferograma con mucho ruido de fondo: contaminación de otro ADN o una contaminación con otro oligonucleótido (normalmente el oligonucleótido antisentido utilizado en la PCR).

Pérdida de resolución: los fragmentos son entre 700-800 pb, a mayor tamaño se pierde resolución.

11.0 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- 11.1 Dideoxinucleótidos** Nucleótidos que carecen de un grupo hidroxilo en la desoxirribosa.
- 11.2 Electroferograma** Representación gráfica de la secuencia de datos producida por un equipo automatizado.
- 11.3 Secuenciación:** La secuenciación permite determinar el orden preciso de nucleótidos en un determinado fragmento de ADN. La secuenciación Sanger es el estándar de oro para confirmar la presencia o ausencia de mutaciones en una secuencia de ADN al compararse con una secuencia de referencia.
- 11.4 Secuencia Antisentido:** Secuencia complementaria del ADN molde.
- 11.5 Secuenciación Sanger** Técnica que permite conocer el orden preciso de nucleótidos de un fragmento de ácido nucléico. Se basa en la polimerización del ADN y el uso de dideoxinucleótidos que sirven como terminadores de la reacción de secuencia.
- 11.6 Analizador genético** Equipo que permite realizar una amplia variedad de estudios como la separación de fragmentos marcados con fluoróforos y secuenciación Sanger.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	8. Instrucción Operativa para Secuenciación Sanger de ADN		HOJA: 12 DE: 12

12.0 FORMATOS, REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441-448.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.

McCann-Crosby, B., Mansouri, R., Dietrich, J. E., McCullough, L. B., Sutton, V. R., Austin, E. G., ... & Hicks, M. J. (2014). State of the art review in gonadal dysgenesis: challenges in diagnosis and management. *International journal of pediatric endocrinology*, 2014(1), 4.

Filges, I., Kunz, C., Miny, P., Boesch, N., Szinnai, G., Wenzel, F., ... & Heinimann, K. (2011). A novel missense mutation in the high mobility group domain of SRY drastically reduces its DNA-binding capacity and causes paternally transmitted 46, XY complete gonadal dysgenesis. *Fertility and sterility*, 96(4), 851-855.

Melzak, K. A., Sherwood, C. S., Turner, R. F., & Haynes, C. A. (1996). Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *Journal of colloid and interface science*, 181(2), 635-644.

Zeillinger, R., Schneeberger, C., Speiser, P., & Kury, F. (1993). A simple method for isolation of DNA from blood clots suited for use in PCR. *Biotechniques*, 14(2), 202-203.

Guía de usuario "DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Applied Biosystems Chemistry Guide" 2a Edición. 2009, Applied Biosystems.

13.0 CAMBIOS EN ESTA VERSIÓN

Versión	Fecha	Propósito de la Revisión	Realizado por

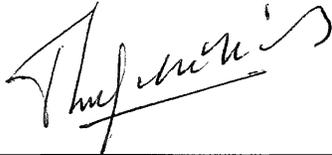
El presente documento fue autorizado por el Comité de Mejora Regulatoria en la tercera sesión extraordinaria de fecha 31/10/2022.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN	CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Autorización		HOJA: 1 DE: 2

AUTORIZACIÓN

ELABORADO POR:



Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz.
 Jefe del Departamento de Genética.

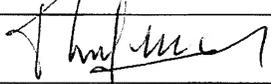


Q.F.B. María Aurelia López Hernández.
 Jefa de Laboratorio.

REVISADO POR:



Dr. Gerardo Gamba Ayala.
 Director de Investigación.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		CÓDIGO: M.T./ 0.6.0.2
	Departamento de Genética Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky		REV: 00
	Autorización		HOJA: 2 DE: 2

REVISIÓN METODOLÓGICA:

Mtro. Miguel Angel Lima Alarcón.
Jefe del departamento de Organización y Modernización Administrativa.

Pas. L.I.A. Perla Donaji Cedillo Miralrio.
Analista especializado de Organización y Modernización.

Lcda. Karen Andrea Villanueva García.
Asesora Externo.

AUTORIZADO POR:

Dr. Gerardo Gamba Ayala.
Director de Investigación.

Dr. José Sifuentes Osornio.
Director General.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre:	Dr. Osvaldo Máximo Mutchinick Baringoltz	Dr. Gerardo Gamba Ayala	Dr. Gerardo Gamba Ayala
Cargo-puesto:	Jefe del Departamento de Genética	Director de Investigación	Director de Investigación
Firma:			
Fecha:	07-10-2022	07-10-2022	07-10-2022