



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

Dirección de Investigación
Subdirección de Investigación Clínica
Coordinación de Hematología Perinatal

Carátula de validación de vigencia

Ciudad de México, a 27 de septiembre de 2024.

Se hace referencia al inciso A) del Procedimiento para la validación de vigencia de las normas internas y transversales en el Sistema de Administración de Normas Internas de la APF (SANI). Con fundamento en el artículo 19 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, el **Manual de Procedimientos Técnicos de la Coordinación de Hematología Perinatal**, registrado en el Inventario de Normas Internas del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer), se encuentra vigente y es aplicable de acuerdo con lo establecido en la misma, **[se actualizo por criterio de cambio de autoridades; validando que la descripción de los procedimientos se encuentran vigentes y son aplicables de acuerdo con lo establecido en la misma]**. Por lo anterior, la Dirección de Investigación valida la vigencia de la norma interna sustantiva:

UR	Clasificación	Nombre	Homoclave	Fecha de publicación /difusión	Fecha de revisión
Coordinación de Hematología Perinatal	MPT	Manual de Procedimientos Técnicos de la Coordinación de Hematología Perinatal	INPER-NIS-0187	27/09/2024	02/09/2024 4

Responsable del documento

Autorizó

QBP. Rocío Trueba Gómez
Coordinadora de Hematología Perinatal

Dr. Enrique Reyes Muñoz
Director de Investigación





INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA



**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DE LA
COORDINACIÓN DE HEMATOLOGÍA PERINATAL**

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]
[Handwritten signature]

Septiembre 2024



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
TÉCNICOS**



HOJA
1

FECHA

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

COORDINACIÓN DE HEMATOLOGÍA PERINATAL

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DE LA
COORDINACIÓN DE HEMATOLOGÍA PERINATAL**

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]
Chirib



DÍA	MES	AÑO
02	09	24

COORDINACIÓN DE HEMATOLOGÍA PERINATAL

ÍNDICE

- I. OBJETIVO DEL MANUAL
- II. MARCO JURÍDICO
- III. PROCEDIMIENTOS:
 1. Registro y etiquetado de muestras
 2. Toma de muestra de sangre venosa
 3. Toma de muestra para la obtención de células de descamación oral
 4. Obtención de DNA a partir de sangre total
 5. Obtención de DNA a partir de células de descamación ora.
 6. Cuantificación de DNA por espectrofotometría ACTGene ASP 3700
 7. Evaluación de la integridad del DNA por electroforesis
 8. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)
 9. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
 10. Técnica de secuenciación automática tipo sanger



DÍA	MES	AÑO
02	09	24

COORDINACIÓN DE HEMATOLOGÍA PERINATAL

I. OBJETIVO DEL MANUAL

Describir los procedimientos de carácter técnico que se realizan en la Coordinación de Hematología Perinatal, para el procesamiento y análisis de muestras biológicas cuya importancia radica en reunir los aspectos vinculados con enfermedades que pueden observarse en la etapa perinatal y neonatal, algunas de ellas son raras, otras sin embargo, son más frecuentes como la hemorragia, la anemia hemolítica hereditaria, las enzimopatías (deficiencia de G6PD, piruvatocinasa, etc.), las adquiridas (Incompatibilidades de grupo Rh, ABO, etc.), la anemia hemolítica autoinmune, las de causa infecciosa intrauterina y perinatal, las anemias debidas a trastornos de la hemoglobina como las hemoglobinopatías estructurales, beta-talasemias (beta0, beta+ y beta++) y alfa-talasemias (siendo la Hb H y Hb Bart las más graves); así mismo, contribuye al desarrollo de líneas de investigación que propician el avance científico y tecnológico en el ámbito de la hematología, y aporta la formación de recursos humanos, en función de las directrices de investigación que tome el INPer, que en función de materia de investigación y enseñanza se encuentran estructuradas con los elementos, criterios, políticas y normas sobre procedimientos técnicos dentro del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

COORDINACIÓN DE HEMATOLOGÍA PERINATAL

II. MARCO JURÍDICO

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.

Leyes

Ley de Planeación.
Ley Orgánica de la Administración Pública Federal.
Ley de los Institutos Nacionales de Salud.
Ley Federal de Derechos.
Ley General de Salud.
Ley General de Educación Superior.
Ley General de Población.
Ley de Infraestructura de la Calidad.
Ley Federal de las Entidades Paraestatales.

Reglamentos

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Prestación de Servicios de Atención Médica.
Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.
Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.
Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y adáveres de Seres Humanos.
Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Sanidad Internacional.

Normas

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del Expediente Clínico.
Norma Oficial Mexicana NOM-024-SSA3-2012, Sistemas de información de registro electrónico para la salud.
Intercambio de información en salud.
Norma Mexicana NMX-R-025-SCFI-2015 en igualdad laboral y no discriminación.

Nota: Para lo no previsto dentro de este marco jurídico, se observará lo establecido en el marco jurídico regulatorio del Manual de Organización Específico del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.



COORDINACIÓN DE HEMATOLOGÍA PERINATAL

III. PROCEDIMIENTOS

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

1.- Registro y etiquetado de muestras

1.- Registro y etiquetado de muestras



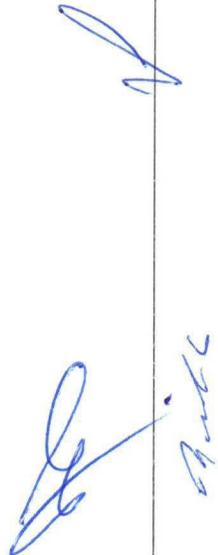


DÍA	MES	AÑO
02	09	24

1.- Registro y etiquetado de muestras

OBJETIVO ESPECÍFICO

Mantener en orden el registro de todas las muestras recibidas para asegurar la identificación correcta de los pacientes, así como resguardar sus datos personales.



DÍA	MES	AÑO
02	09	24

1.- Registro y etiquetado de muestras

POLÍTICAS DE OPERACIÓN

Sera obligación del:

Medico Solicitante

- Elaborar la solicitud para la realizacion de estudios debidamente requisitada.
- Tomar la muestra de sangre venosa de acuerdo con lo estipulado en este procedimiento, en caso de que el paciente se encuentre hospitalizado
- Enviar las muestras a la Coordinación de Hematologia Perinatal con la solicitud elaborada que debiera incluir los identificadores universales del paciente. Siendo tomados como identificadores universlaes los siguientes datos:
 - a) Apellido Paterno, Materno y Nombre(s).
 - b) Fecha de Nacimiento (DD/MM/AAAA).
 - c) Número de Expediente del Instituto Nacional de Perinatología.
 - d) Servicio solicitante, Médico Solicitante (nombre completo, extensión telefónica de contacto y clave de adscripción en el Instituto Nacional de Perinatología.
 - e) Nombre del Protocolo y número de Registro.
 - f) Género, edad, datos necesarios del protocolo asignando, medicamentos.
 - g) Fecha de toma de muestra.

Profesional de Laboratorio

- Recibir cordialmente a los pacientes que lleguen para toma de muestra que se realizara en el consultorio asignado previamente
- Verificar los datos de identificación del o los pacientes en la solicitud de estudios debidamente requisitada.
- Realizar el registro de los identificadores universales del paciente en la libreta de ingreso de pacientes de la Coordinación de Hematología Perinatal.
- Actualizar la base de cada que se tome una muestra.

1.- Registro y etiquetado de muestras

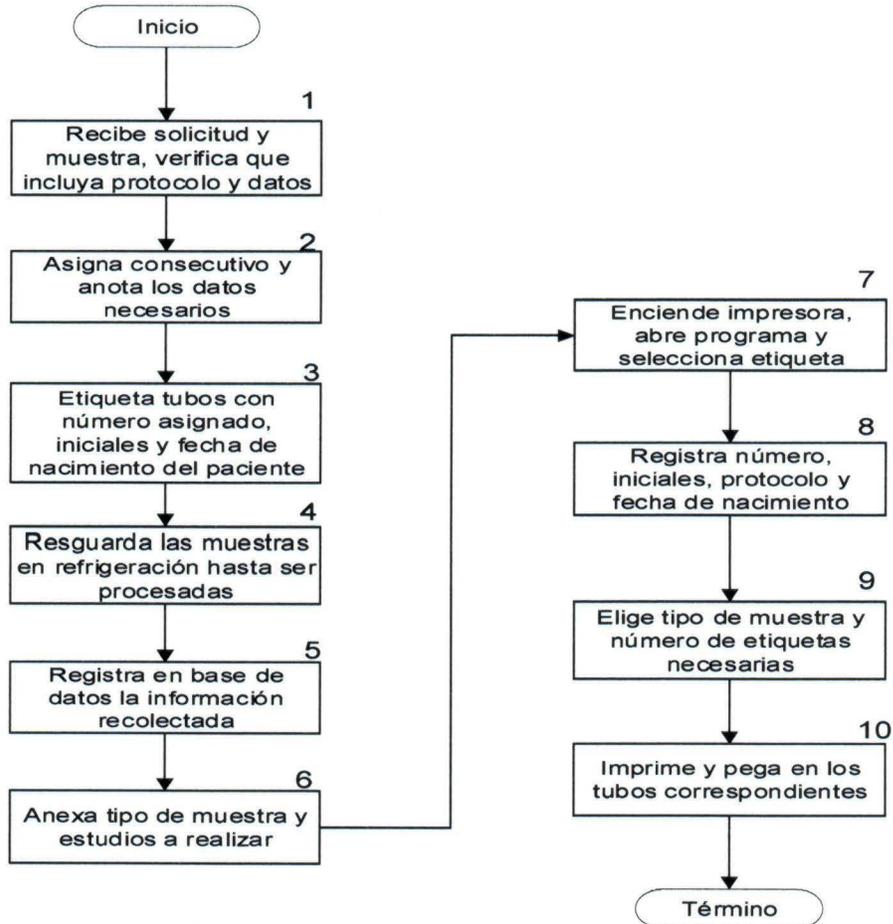
PERSONAL QUE INTERVIENE	ACT. No.	DESCRIPCIÓN
Personal de la Coordinación de Hematología Perinatal	1	Recibe la solicitud y la muestra etiquetada, verifica que incluya el protocolo asignado, nombre completo, edad, registro INPer, fecha de nacimiento y los datos necesarios para el protocolo.
	2	Asigna en la libreta el número consecutivo de muestra (anotando "no se tomó en la Coordinación de Hematología Perinatal") y anota nombre completo, edad, registro INPer, fecha de nacimiento y los datos necesarios de acuerdo al protocolo asignado.
	3	Etiqueta todos los tubos con el número consecutivo asignado, las iniciales del paciente (nombre y apellido) y fecha de nacimiento.
	4	Resguarda las muestras en refrigeración (4° C) hasta ser procesadas por no más de 24 horas.
	5	Registra en la base de datos toda la información recolectada, respetando el orden de la libreta.
	6	Anexa el tipo de muestra y estudios que se realizarán.
	7	Enciende impresora Zebra GC420, abre programa ZEBRA FONT en la computadora y selecciona el tipo de etiqueta (tubo primario o tubo almacenamiento)
	8	Registra número consecutivo de muestra, las iniciales (nombre y apellidos), protocolo y fecha de nacimiento.
	9	Elige tipo de muestra (DNA, Plasma o Leucocitos) y número de etiquetas necesarias.
	10	Imprime y pega en los tubos correspondientes.
		Termina procedimiento



DÍA	MES	AÑO
02	09	24

1.- Registro y etiquetado de muestras

Personal de la Coordinación de Hematología Perinatal





DÍA	MES	AÑO
02	09	24

2.- Toma de muestra de sangre venosa

2.- Toma de muestra de sangre venosa

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]



DÍA	MES	AÑO
02	09	24

2.- Toma de muestra de sangre venosa

OBJETIVO

Uniformar y sistematizar la toma de muestra de sangre venosa.

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

2.- Toma de muestra de sangre venosa

POLÍTICAS DE OPERACIÓN

Será obligación del:

Médico Solicitante

- Elaborar la solicitud para la realización de estudios debidamente requisitada.
- Tomar la muestra de sangre venosa de acuerdo con lo estipulado en este procedimiento, en caso de que el paciente se encuentre hospitalizado,
- Enviar las muestras a la Coordinación de Hematología Perinatal con la solicitud elaborada que deba incluir los identificadores universales del paciente. Siendo tomados como identificadores universales los siguientes datos:
 - a) Apellido Paterno, Materno y Nombre(s).
 - b) Fecha de Nacimiento (DD/MM/AAAA).
 - c) Número de Expediente del Instituto Nacional de Perinatología.
 - d) Servicio solicitante, Médico Solicitante (nombre completo, extensión telefónica de contacto y clave de adscripción en el Instituto Nacional de Perinatología).
 - e) Nombre del Protocolo y número de Registro.
 - f) Género, edad, diagnóstico, datos clínicos, medicamentos.
 - g) Estudios Solicitados.
 - h) Fecha de toma de muestra.

Profesional de Laboratorio

- Verificar los datos de identificación del o los pacientes.
- Realizar el registro de los identificadores universales del paciente en la libreta de ingreso de pacientes de la Coordinación de Hematología Perinatal.
- Corroborar que el o los pacientes tengan un ayuno de lípidos mayor a cuatro horas.
- Utilizar guantes al momento de la toma de muestra.
- Disponer de los tubos de recolección de acuerdo al tipo de estudio solicitado: Tipo de tubo para la toma de muestra para los estudios moleculares realizados en la Coordinación de Hematología Perinatal

2.- Toma de muestra de sangre venosa

PERSONAL QUE INTERVIENE	ACT. No.	DESCRIPCIÓN
Médico Solicitante	1	Elabora solicitud para realización de estudios moleculares y verifica que el paciente sea ambulatorio.
	2	¿Procede? No: Toma la muestra (en caso de que el paciente se encuentre hospitalizado) y envía a junto con la solicitud (debidamente llenada) a la Coordinación de Hematología Perinatal. Pasa a Act. 20.
	3	Sí: Entrega solicitud al paciente ambulatorio e indica acuda a la Coordinación de Hematología Perinatal para programación de toma de muestra.
Profesional de Laboratorio	4	Recibe al paciente ambulatorio y le agenda fecha de toma de muestra en la solicitud y brinda indicaciones (ayuno mínimo de 4 horas con ingesta nula de grasas y uso de cubrebocas).
	5	Recibe al paciente el día estipulado con solicitud en mano, comprueba datos y asigna el número consecutivo en la libreta de registro de pacientes de la Coordinación de Hematología Perinatal.
	6	Explica el procedimiento mediante el cual se le tomará la muestra de sangre venosa; de tratarse de un infante, explica al familiar cómo deberá sostenerlo para proceder a la toma de muestra.
	7	Verifica que las horas de ayuno del paciente sean las adecuadas y pregunta sobre posibles alergias al látex (para uso adecuado de guantes y del torniquete).
	8	Prepara el material necesario para la toma de muestra: 2 tubos con EDTA como anticoagulante, torundas humedecidas con alcohol etílico al 70%, gasas, set estéril de extracción de sangre: aguja o cánula mariposa y tubo con conexión Luer adaptador múltiples, ligadura, banda adhesiva estéril circular y guantes de látex.
	9	Identifica los tubos rotulándolos con el número consecutivo asignado en la libreta de ingresos, frente al paciente.
	10	Limpia el área de toma de muestras con desinfectante, higieniza sus manos y se coloca guantes.
	11	Usa el sistema de extracción de Sangre S-Monovette, tira recto el émbolo hasta que encaje con un "click" y rompe el émbolo ("crac") para que el sistema funcione al vacío.
	12	Selecciona la vena adecuada para la punción localizándola con el dedo índice y/o medio, realiza asepsia con torunda de algodón humedecida con alcohol al 70% (de manera circular de adentro hacia afuera) y deja secar al aire.
	13	Destapa la aguja, la deja en su envoltorio, coloca la ligadura o torniquete a 10 cm de distancia donde tomará la muestra y relocaliza la vena.

2.- Toma de muestra de sangre venosa

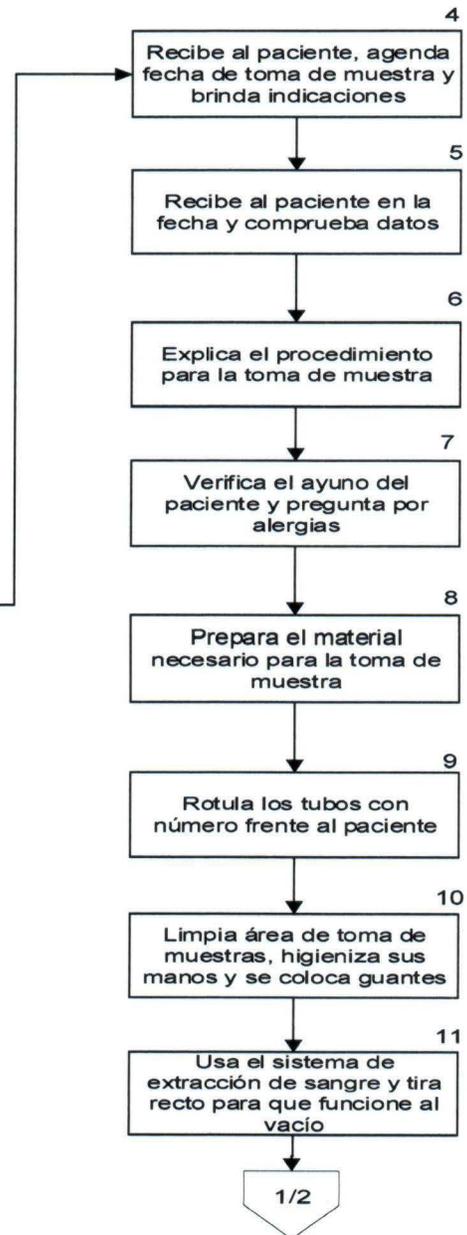
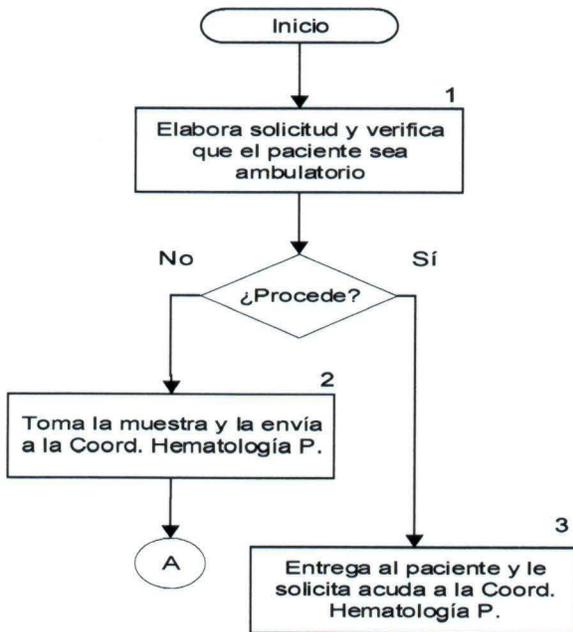
PERSONAL QUE INTERVIENE	ACT. No.	DESCRIPCIÓN
Profesional de Laboratorio	14	Punciona la vena seleccionada con el bisel de la aguja hacia arriba, introduce cánula de mariposa (aguja) en el centro de la vena y penetra a lo largo de la misma (el ángulo de punción debe ser menor de 30°).
	15	Introduce el tubo mediante enroscamiento con EDTA (como anticoagulante) en la conexión de la cánula de mariposa, hasta llenar el tubo con la cantidad de sangre necesaria.
	16	Mezcla la sangre invirtiendo los tubos suavemente varias veces.
	17	Repite con los tubos necesarios.
	18	Retira el torniquete tirando del extremo indicado y coloca una gasa sobre la piel donde se encuentra oculta la punta de la aguja.
	19	Verifica nuevamente la identificación del paciente y coloca las muestras en gradilla.
	20	Recibe las muestras del paciente hospitalizado que lleva el médico tratante con solicitud en mano, comprueba datos con el médico tratante y asigna el número consecutivo en la libreta de registro de pacientes de la Coordinación de Hematología Perinatal.
	21	Guarda las muestras para su procesamiento.
		TERMINA EL PROCEDIMIENTO

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

2.- Toma de muestra de sangre venosa

Médico solicitante

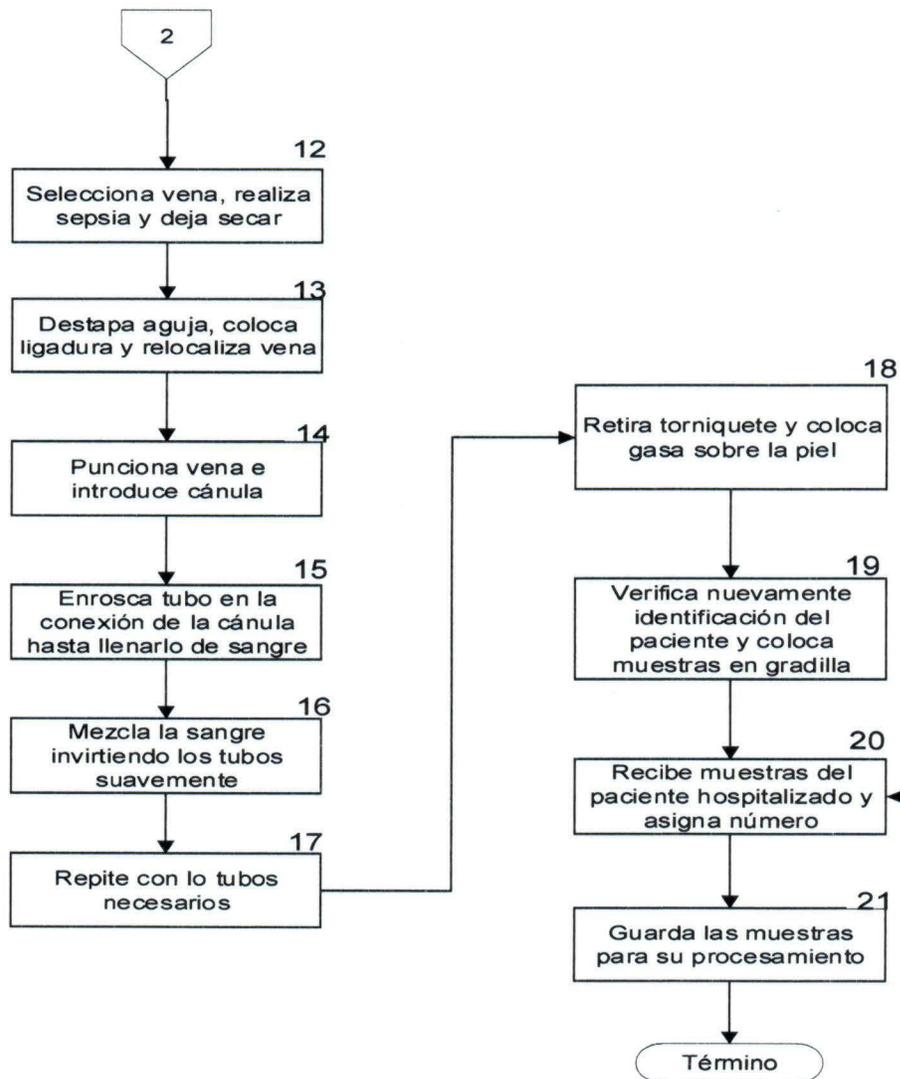
Profesional de Laboratorio



DÍA	MES	AÑO
02	09	24

2.- Toma de muestra de sangre venosa

Profesional de Laboratorio





DÍA	MES	AÑO
02	09	24

3.- Toma de muestra para la obtención de DNA
a partir de células de descamación de mucosa oral

3.- Toma de muestra para la obtención células de descamación de mucosa oral

Chick

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

3.- Toma de muestra para la obtención de DNA
a partir de células de descamación de mucosa oral

OBJETIVO ESPECÍFICO

Uniformar y sistematizar la recolección de células de descamación de mucosa oral como método no invasivo para la obtención de muestras de DNA.

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

3.- Toma de muestra para la obtención de DNA
a partir de células de descamación de mucosa oral

POLÍTICAS DE OPERACIÓN

Será obligación del:

Médico Solicitante

- Especificar los datos necesarios al momento de requisitar la solicitud para la realización de estudios moleculares.
- Tomar las muestras de células de descamación de mucosa oral, en caso de que el paciente se encuentre hospitalizado de acuerdo a lo señalado en este procedimiento.
- Enviar las muestras a la Coordinación de Hematología Perinatal con la solicitud elaborada que deberá incluir los identificadores universales del paciente. Siendo tomados como identificadores universales los siguientes datos:
 - Apellido Paterno, Materno y Nombre(s).
 - Fecha de Nacimiento (DD/MM/AAAA).
 - Número de Expediente del Instituto Nacional de Perinatología.
 - Servicio solicitante, Médico Solicitante (nombre completo, extensión telefónica de contacto y clave de adscripción en el Instituto Nacional de Perinatología).
 - Nombre del Protocolo y número de Registro.
 - Género, edad, diagnóstico, datos clínicos, medicamentos.
 - Estudios Solicitados.
 - Fecha de toma de muestra.

Profesional de Laboratorio

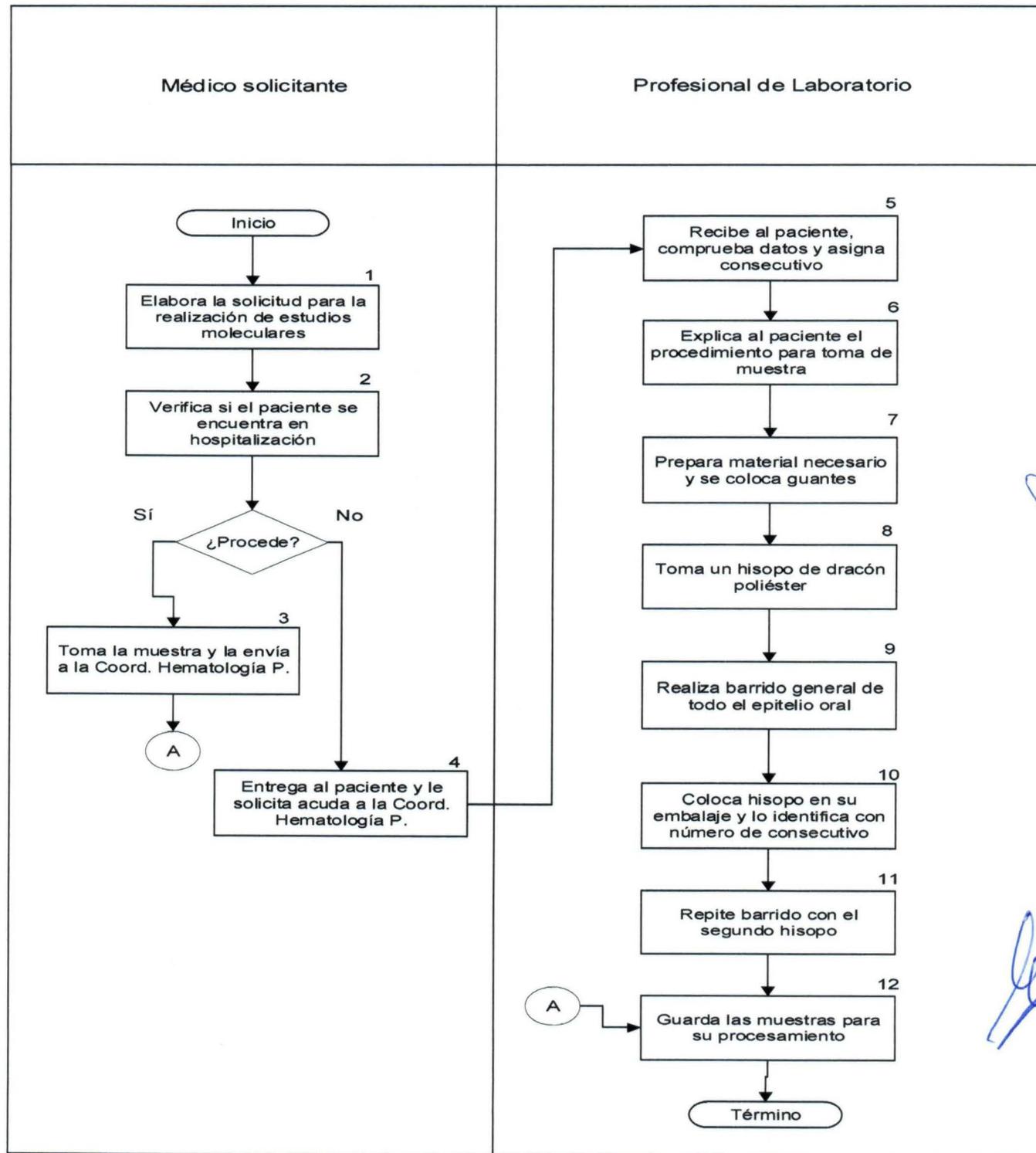
- Preparar el equipo necesario para la toma de muestras: guantes, hisopos de dacrón poliéster y marcador indeleble.
- Verificar los datos de identificación del o los pacientes para realizar el registro correcto de los identificadores universales en la libreta de ingreso de registro de la Coordinación de Hematología Perinatal.
- Corroborar en el caso de lactantes con alimentación al seno materno, que haya transcurrido al menos dos horas desde la última toma, esto cuando la toma se realiza en el consultorio ubicado en la planta baja de la torre de investigación.
- Utilizar y preparar el equipo necesario para la toma de muestras como son: guantes para el momento de la toma con hisopos de dacrón poliéster.

3.- Toma de muestra para la obtención de DNA
a partir de células de descamación de mucosa oral

PERSONAL QUE INTERVIENE	ACT. No.	DESCRIPCIÓN
Médico Solicitante	1	Elabora la solicitud para la realización de estudios moleculares.
	2	Verifica si el paciente se encuentra en hospitalización ¿Procede?
	3	Sí: Toma las muestras de células de descamación de mucosa oral y entrega a la Coordinación de Hematología Perinatal. Pasa a Act. 12
	4	No: Entrega al paciente y le solicita acuda a la Coordinación de Hematología Perinatal para la toma de muestra.
Profesional de Laboratorio	5	Recibe al paciente con solicitud en mano, comprueba datos y asigna el número consecutivo en la libreta de registro; o bien, recibe las muestras cotejando con el médico tratante los datos del paciente hospitalizado.
	6	Explica al paciente el procedimiento mediante el cual se le tomará la muestra de mucosa oral; de tratarse de un infante, da explicación al familiar de cómo sostenerlo para la toma de muestra.
	7	Prepara el material necesario para la toma de muestra (2 Hisopos de dacrón poliéster) y se coloca guantes de látex.
	8	Toma un hisopo de dacrón poliéster y lo abre teniendo cuidado de no contaminarlo.
	9	Realiza un barrido general de todo el epitelio oral comenzando con la cara interna de la mejilla, después encías y continua del otro lado de la cavidad oral en el mismo orden; realiza raspado girando el hisopo mientras toma la muestra (En caso de que la cavidad oral se encuentre muy seca realiza un barrido del paladar y lengua para asegurar la recolección de células de descamación.)
	10	Coloca el hisopo en su empaque original teniendo cuidado de no contaminarlo y lo identifica con el número consecutivo que se le asigno en la libreta de registro.
	11	Repite el barrido e identificación con el segundo hisopo y coloca el hisopo en el empaque original.
	12	Guarda las muestras para su procesamiento.
		Termina procedimiento

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

3.- Toma de muestra para la obtención de DNA
a partir de células de descamación de mucosa oral





DÍA	MES	AÑO
02	09	24

4.- Obtención de DNA a partir de sangre total

4.- Obtención de DNA a partir de sangre total

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]



DÍA	MES	AÑO
02	09	24

4.- Obtención de DNA a partir de sangre total

OBJETIVO ESPECÍFICO

Obtener DNA con las características de concentración, pureza e integridad necesarias para el desarrollo de técnicas de biología molecular utilizadas en protocolos de investigación.

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

4.- Obtención de DNA a partir de sangre total

POLÍTICAS DE OPERACIÓN

Será obligación del:

Profesional de la Coordinación de Hematología Perinatal:

- 1.- Verificar la concordancia de los datos de la solicitud con los de la identificación de la(s) muestras.
- 2.- Verificar que la muestra cumpla con los siguientes requisitos:
 - a) Las muestras se recibirán de lunes a viernes de 8:00 a 14:00
 - b) Se deberá entregar dos tubos de 3ml con EDTA como anticoagulante, para el caso de pacientes neonatales la muestra deberá tomarse en tubo microtainer.
 - c) Las muestras no deber estar lipémicas ni hemolisadas o coaguladas.
 - d) La vigencia de las muestras no será mayor a dos semanas debidamente conservadas en refrigeración.
- 3.- Ingresar los datos de la muestra en los bancos de datos físicos e informáticos.
- 4.- Centrifugar a velocidad máxima la preparación de un DNA de capa leucocitaria o de linfocitos, para evitar formación de aglomerados.
- 5.- Colocar los desechos líquidos en el contenedor para líquidos RPBI y los tubos en la bolsa de color naranja.

4.- Obtención de DNA a partir de sangre total

PERSONAL QUE INTERVIENE	ACT .No.	DESCRIPCIÓN
Investigadores, Químicos, Biólogos y Estudiantes capacitados de la Coordinación de Hematología Perinatal	1	Emplea el reactivo comercial QIAamp® DNA mini Kit, Marca QIAGEN, No. de Catálogo 51106 y verifica que esté completo (buffer de lisis AL; proteínasa K, recombinante grado de PCR; buffers de lavado AW1 y AW2 y buffer de elución).
	2	Verifica la existencia del material adicional al reactivo comercial indispensable para trabajar (etanol absoluto; centrífuga de mesa con velocidad hasta 14000 rpm; tubos de microcentrífuga de 1.5 ml estériles (eppendorf); pipetas de volumen de 1000, 200, 50 microlitros; puntas estériles de diferentes volúmenes para las pipetas; marcador indeleble; guantes y contenedor para los desechos).
	3	Verifica la concordancia de los datos de la solicitud con los de la identificación de la muestra.
	4	Limpia la mesa de trabajo con solución desinfectante y se coloca guantes limpios para trabajar las muestras.
	5	Identifica los dos tubos tipo eppendorf de 1.5 mL estériles con el número de registro, en la parte de la tapa con marcador indeleble.
	6	Coloca 3 tubos recolectores para los desechos y en el primero coloca la columna de fibra de vidrio y marca con el número de registro correspondiente a la muestra a procesar.
	7	Coloca 200 µL de sangre total previamente mezclada por inversión y posteriormente con la punta estéril en tubos eppendorf (si el volumen es menor a 200 µL, agrega un volumen complementario de PBS 1X cantidad basta para 200 µL)
	8	Pipetea 20 µL de Proteasa QIAGEN y coloca en un tubo eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetado.
		Lisis Celular
	9	Añade 200 µL del Buffer AL (Buffer de Lisis), mezcla vigorosamente en vortex e incuba a 56°C por 10 minutos en termoblock.
	10	Toma los tubos de muestra, después del tiempo de incubación y da un spin en centrífuga a 8000 rpm para bajar el contenido de la tapa del tubo eppendorf.
11	Añade 200 µL de etanol (96-100%), mezcla vigorosamente en vortex y da un spin para bajar el contenido de la tapa del tubo a 8000 rpm.	

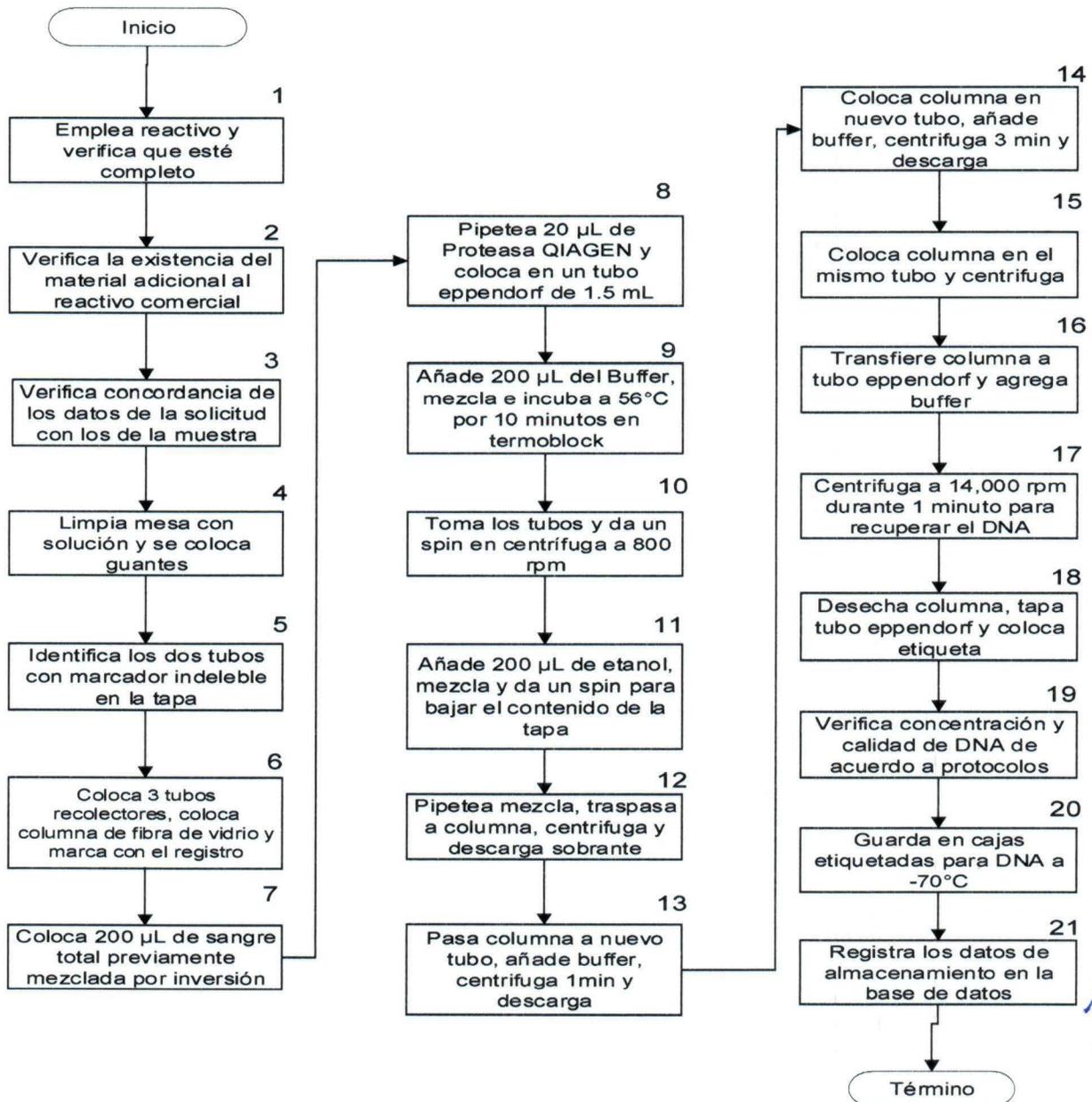
4.- Obtención de DNA a partir de sangre total

PERSONAL QUE INTERVIENE	ACT .No.	DESCRIPCIÓN
Investigadores, Químicos, Biólogos y Estudiantes capacitados de la Coordinación de Hematología Perinatal	12	Pipetea la mezcla, la traspasa a la columna (QIAamp mini spin columna), centrifuga a 8000 rpm por 1 minuto y descarga el sobrante del tubo de recolección en un frasco de deshechos.
	Lavado	
	13	Pasa la Columna a un nuevo tubo de recolección de 2 mL y añade 500 µL del Buffer AW1 , centrifuga a 8000 rpm por 1 minuto y descarga el sobrante del tubo de recolección.
	14	Coloca la columna en un nuevo tubo de recolección, añade 500 µL del Buffer AW2 , centrifuga a velocidad máxima 14,000 rpm por 3 minutos y descarga el sobrante del tubo sin tirar el tubo de recolección.
	Secado	
	15	Coloca la columna en el mismo tubo de recolección y centrifuga una vez más a 14,000 rpm durante 1 minuto para eliminar el exceso de Buffer AW2.
	Elución	
	16	Transfiere la columna en un tubo eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetado y agrega 200 µL de Buffer AE (Buffer de Elución) o agua destilada.
	17	Centrifuga a 14,000 rpm durante 1 minuto para recuperar el DNA.
	18	Desecha la columna en la bolsa de recolección color naranja, tapa el tubo eppendorf que contiene el DNA extraído y coloca la etiqueta correspondiente.
19	Verifica concentración y calidad de DNA de acuerdo con los protocolos establecidos.	
20	Guarda en las cajas etiquetadas para DNA en el lugar correspondiente a -70°C.	
21	Registra los datos de almacenamiento en la base de datos electrónica.	
		TERMINA PROCEDIMIENTO

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

4.- Obtención de DNA a partir de sangre total

Investigadores, Químicos, Biólogos y Estudiantes capacitados de la
Coordinación de Hematología Perinatal





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
TÉCNICOS DE LA
COORDINACIÓN DE HEMATOLOGÍA
PERINATAL



HOJA
1

FECHA

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

5.- Obtención de DNA a partir de células de descamación oral

5.- Obtención de DNA a partir de células de descamación oral

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

5.- Obtención de DNA a partir de células de descamación oral

OBJETIVO ESPECÍFICO

Obtener DNA con las características de concentración, pureza e integridad necesarias para el desarrollo de técnicas de biología molecular utilizadas en protocolos de investigación.

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

5.- Obtención de DNA a partir de células de descamación oral

POLÍTICAS DE OPERACIÓN

Será obligación del:

Coordinador/a de Hematología Perinatal

- Verificar la concordancia de los datos de la solicitud con los de la identificación de la(s) muestras.
- Verificar que la muestra cumpla con los siguientes requisitos:
 - a) Las muestras se recibirán de lunes a viernes de 8:00 a 14:00
 - b) Se deberá revisar que sean dos hisopos de dacrón-poliéster y colocados en las bolsas de recolección entregadas.
 - c) La vigencia de las muestras no será mayor a dos semanas debidamente conservadas en refrigeración.
- Ingresar los datos de la muestra en los bancos de datos físicos e informáticos.

5.- Obtención de DNA a partir de células de descamación oral

PERSONAL QUE INTERVIENE	ACT. No.	DESCRIPCIÓN
Investigadores, Químicos, Biólogos y Estudiantes capacitados de la Coordinación de Hematología Perinatal	1	Emplea el reactivo comercial QIAamp® DNA mini Kit, Marca QIAGEN, No. de Catálogo 51106 y verifica que esté completo (buffer de lisis AL; proteínasa K, recombinante grado de PCR; buffers de lavado AW1 y AW2 y buffer de elución).
	2	Verifica la existencia del material adicional al reactivo comercial indispensable para trabajar (etanol absoluto; centrífuga de mesa con velocidad hasta 14000 rpm; tubos de microcentrífuga de 1.5 ml estériles (ependorf); pipetas de volumen de 1000, 200, 50 microlitros; puntas estériles de diferentes volúmenes para las pipetas; marcador indeleble; guantes y contendor para los desechos).
	3	Verifica la concordancia de los datos de la solicitud con los de la identificación de la muestra.
	4	Limpia la mesa de trabajo con solución desinfectante y se coloca guantes limpios para trabajar las muestras.
	5	Identifica los 4 tubos tipo eppendorf de 1.5 mL estériles con el número de registro, en la parte de la tapa con marcador indeleble.
	6	Coloca 4 tubos recolectores para los desechos, en el primero coloca la columna de fibra de vidrio y marca con el número de registro correspondiente a la muestra a procesar.
	7	Coloca 400 µL de PBS 1X a los tubos eppendorf y coloca los hisopos y los exprime.
	8	Pipetea 20 µL de Proteasa QIAGEN y lo coloca en un tubo eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetado
		Lisis Celular
	9	Añade 200 µL del Buffer AL (Buffer de Lisis), mezcla vigorosamente en vortex e incuba a 56°C por 10 minutos en termoblock.
	10	Toma los tubos de muestra, después del tiempo de incubación y da un spin en centrífuga a 8000 rpm para bajar el contenido de la tapa del tubo eppendorf.
11	Pipetea la mezcla, la traspasa a la columna (QIAamp mini spin columna), y centrifuga a 8000 rpm por 1 minuto. Descarga el sobrante del tubo de recolección en un frasco de desechos. máxima para evitar la formación de aglomerados. Nota: Los desechos líquidos se colocan en el contenedor para líquidos RPBI y los tubos en la bolsa de color naranja.	

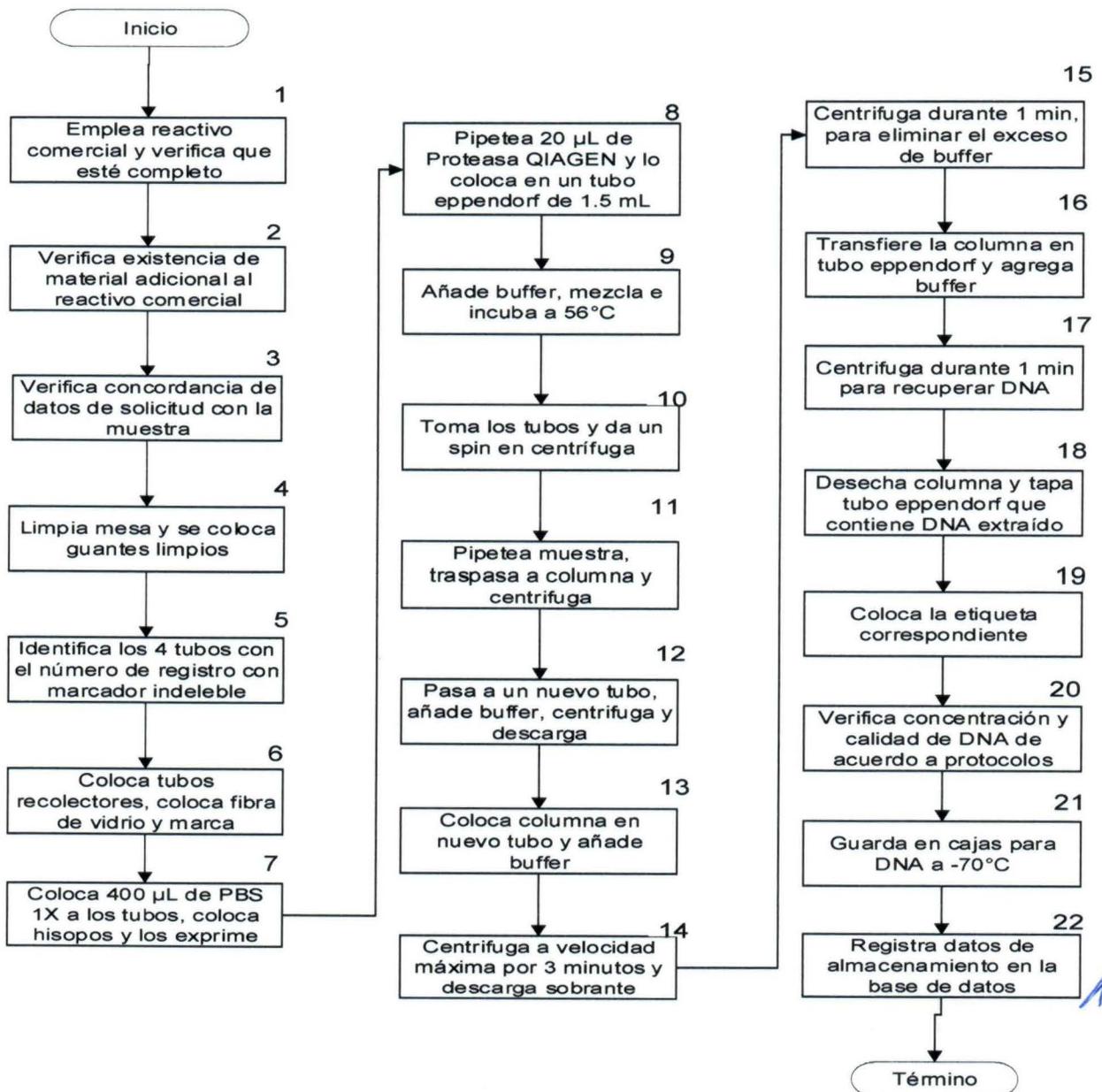
5.- Obtención de DNA a partir de células de descamación oral

PERSONAL QUE INTERVIENE	ACT. No.	DESCRIPCIÓN
Investigadores, Químicos, Biólogos y Estudiantes capacitados de la Coordinación de Hematología Perinatal	12	Lavado Pasa la Columna a un nuevo tubo de recolección de 2 mL y añadir 500 µL del Buffer AW1 , centrifuga a 8,000 rpm por un minuto y descarga el sobrante del tubo de recolección.
	13	Coloca la columna en un nuevo tubo de recolección y añadir 500 µL del Buffer AW2
	14	Centrifuga a velocidad máxima 14,000 rpm por 3 minutos y escarga el sobrante del tubo sin tirar el tubo de recolección. RECOMENDADO: Coloca la columna en el mismo tubo de recolección y centrifuga a 14,000 rpm por un minuto. Para eliminar la posibilidad de acarrear el Buffer AW2.
	15	Secado Centrifuga una vez más a 14,000 rpm durante 1 minuto para eliminar el exceso de Buffer AW2.
	16	Elución Transfiere la columna en un tubo eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetado y agregar 200 µL de Buffer AE (Buffer de Elución) o agua destilada.
	17	Centrifuga a 14,000 rpm durante 1 minuto para recuperar el DNA.
	18	Desecha la columna en la bolsa de recolección color naranja y tapa el tubo eppendorf que contiene el DNA extraído.
	19	Coloca la etiqueta correspondiente.
	20	Verifica concentración y calidad de DNA de acuerdo con los protocolos establecidos.
	21	Guarda en las cajas etiquetadas para DNA en el lugar correspondiente a -70°C.
	22	Registra los datos de almacenamiento en la base de datos electrónica.

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

5.- Obtención de DNA a partir de células de descamación oral

Investigadores, Químicos, Biólogos y Estudiantes capacitados de la
Coordinación de Hematología Perinatal



DÍA	MES	AÑO
02	09	24

6.- Cuantificación de DNA por espectrofotometría
ACTGene ASP 3700

6.- Cuantificación de DNA por espectrofotometría
ACTGene ASP 3700

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

6.- Cuantificación de DNA por espectrofotometría
ACTGene ASP 3700

OBJETIVO ESPECÍFICO

Cuantificar, calificar y verificar que el DNA obtenido en las extracciones cumpla con las características necesarias para ser utilizado en las metodologías de biología molecular empleadas en los protocolos de investigación.

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

6.- Cuantificación de DNA por espectrofotometría
ACTGene ASP 3700

POLÍTICAS DE OPERACIÓN

Será obligación del:

Coordinador/a de Hematología Perinatal:

- Verificar la concordancia de los datos obtenidos del equipo ACTGene al evaluar el material genético:
 - a) Se analizará el rendimiento de DNA por duplicado mediante espectrofotometría.
 - b) La concentración mínima aceptable será de 5 ng/ μ L de DNA por muestra.
 - c) La pureza aceptable será determinará por dos valores: el primer valor será 1.8 producto de la división del valor de absorbancia a 260 nm y 280 nm, el segundo valor será aceptado entre el rango de 2.0 a 2.2 como resultado de la división de los valores de absorbancia a 260 nm y 230 nm.

Lo anterior, de acuerdo a la La ley de Lambert-Beer, que indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica del DNA es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el DNA, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO). En el caso de ADN genómico o de doble cadena, una densidad óptica equivale a 50 ug/ml. Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en nanogramos/microlitro (ng/ μ l). En el caso de algunos equipos como el espectrofotómetro Actgene 3700, no es necesario diluir la muestra y el equipo nos proporciona directamente la concentración en ng/ μ l. Considerando que para una reacción de PCR se requieren de 10 a 200 ng debemos obtener al menos, 5 ng/ μ l de DNA en cada muestra, si se recuperaron 50 μ l, el rendimiento neto de la extracción sería de 0.25 ug. Concentraciones menores dificultan la estandarización de la PCR u otras técnicas. Para estimar la pureza del DNA se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como DNA puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol.

- Ingresar los resultados del material genético de la muestra en los bancos de datos físicos e informáticos.
- Valorar las muestras por electroforesis en un gel de agarosa al 2% para verificar su integridad.
- Cuantificar y analizar mediante electroforesis el ADN y almacenar a -70 °C.

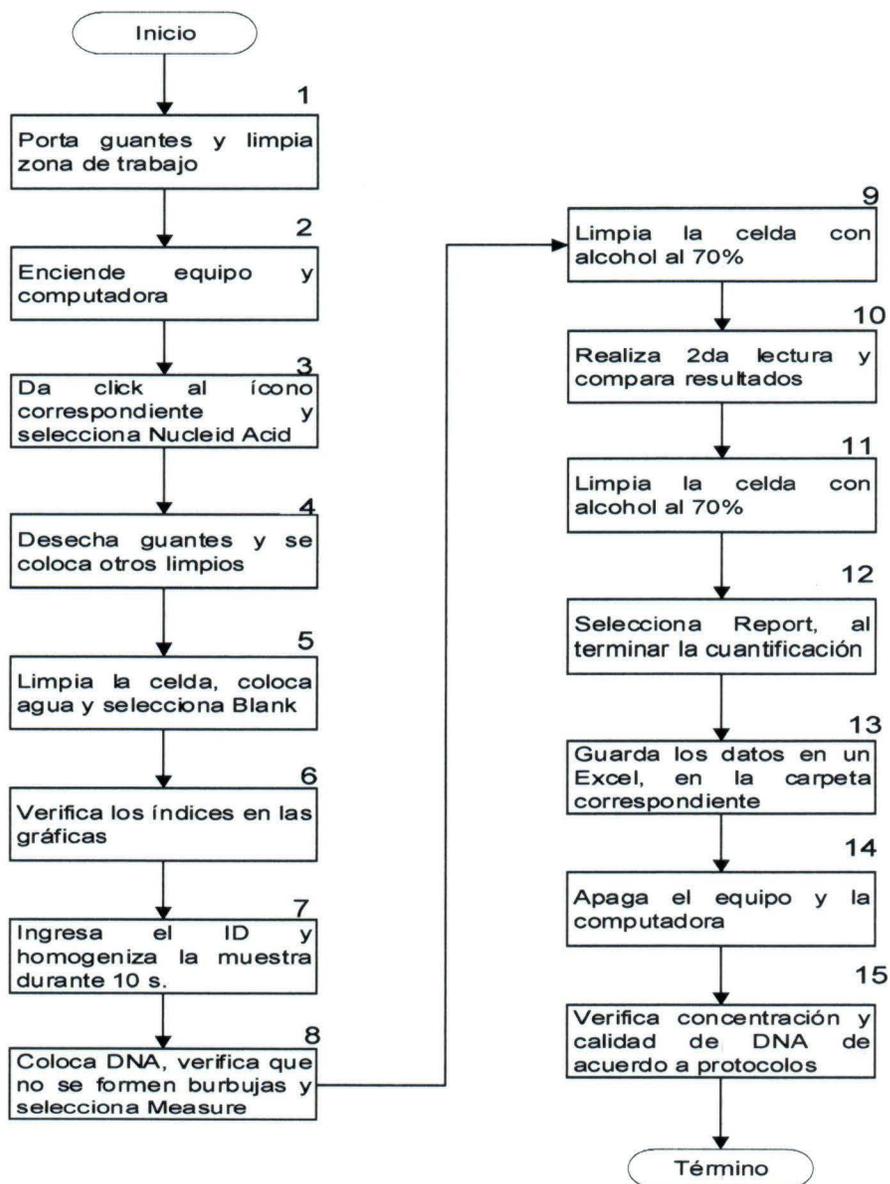
6.- Cuantificación de DNA por espectrofotometría
ACTGene ASP 3700

PERSONAL QUE INTERVIENE	ACT. No.	DESCRIPCIÓN
Investigadores, Químicos, Biólogos y Estudiantes capacitados de la Coordinación de Hematología Perinatal	1	Porta guantes y limpia zona de trabajo con desinfectante.
	2	Enciende equipo ACTGene (ASP-3700) y la computadora donde esté instalado el software ASP-3700.
	3	Da click al icono del ASP-3700 y selecciona Nucleid Acid.
	4	Desecha guantes y se coloca otros limpios para trabajar las muestras.
	5	Limpia la celda con alcohol al 70%, coloca 2µl de agua o buffer de elución del DNA en el centro de la celda verificando que no se formen burbujas y selecciona Blank.
	6	Verifica en las gráficas que los índices 260/280 y 260/230 tengan un valor de cero, de lo contrario repite los pasos 3 y 4.
	7	Ingresa el ID de la muestra en el recuadro de Sample ID y homogeniza la muestra en el vortex durante 10s.
	8	Coloca 2µl de DNA en el centro de la celda verificando que no se formen burbujas y selecciona Measure.
	9	Limpia la celda con alcohol al 70%
	10	Realiza una segunda lectura de la muestra, compara los resultados y gráfico con la anterior; si no son homogéneos repite el paso 9 y realiza una tercera lectura.
	11	Limpia la celda con alcohol al 70%
	12	Selecciona Report, al terminar la cuantificación de las muestras.
	13	Guarda los datos obtenidos de las lecturas en un Excel, lo nombra como: "Protocolo_fecha_MXXXX-MXXX" MXXXX (M: muestra; XXXX: número) y lo guarda en la carpeta del protocolo correspondiente.
	14	Selecciona Exit en la ventana Nucleid Acid, apaga el equipo ACTGene, selecciona Exit en el programa ASP-3700 y apaga la computadora.
	15	Verifica concentración y calidad de DNA de acuerdo con los protocolos establecidos.
		Termina procedimiento

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

6.- Cuantificación de DNA por espectrofotometría
ACTGene ASP 3700

Investigadores, Químicos, Biólogos y Estudiantes capacitados de la Coordinación de Hematología Perinatal





DÍA	MES	AÑO
02	09	24

7.- Evaluación de la integridad del DNA por electroforesis

7.- Evaluación de la integridad del DNA por electroforesis

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]



DÍA	MES	AÑO
02	09	24

7.- Evaluación de la integridad del DNA por electroforesis

OBJETIVO ESPECÍFICO

Evaluar que el DNA obtenido en las extracciones cumpla con las características necesarias de integridad para ser utilizado en las metodologías de biología molecular empleadas en los protocolos de investigación.

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

7.- Evaluación de la integridad del DNA por electroforesis

POLÍTICAS DE OPERACIÓN

Será obligación del:

Coordinador/a de Hematología Perinatal

- Verificar la concordancia de los datos obtenidos evaluar la integridad del material genético:
 - a) Se analizará la integridad del DNA mediante electroforesis.

Lo anterior, de acuerdo a que la electroforesis en gel de agarosa es la forma más fácil y común de separar y analizar el ADN. El propósito del gel podría ser observar el ADN, cuantificarlo o aislar una banda particular. El ADN se visualiza en el gel mediante la adición de syber™ safe. Se une fuertemente al ADN al intercalarse entre las bases y se puede observar en un transiluminador.

La mayoría de los geles de agarosa se elaboran entre 0,7% y 2%. Un gel al 0,7% mostrará una buena separación (resolución) de fragmentos grandes de ADN (5 a 10 kb) y un gel al 2% mostrará una buena resolución para fragmentos pequeños (0,2 a 1 kb). Algunas personas llegan hasta el 3% para separar fragmentos muy pequeños, pero en este caso es más apropiado un gel de poliacrilamida vertical. Los geles de bajo porcentaje son muy débiles y pueden romperse al intentar levantarlos. Los geles con un alto porcentaje suelen ser quebradizos y no se fijan de manera uniforme.

- Ingresar los resultados del material genético de la muestra en los bancos de datos físicos e informáticos.

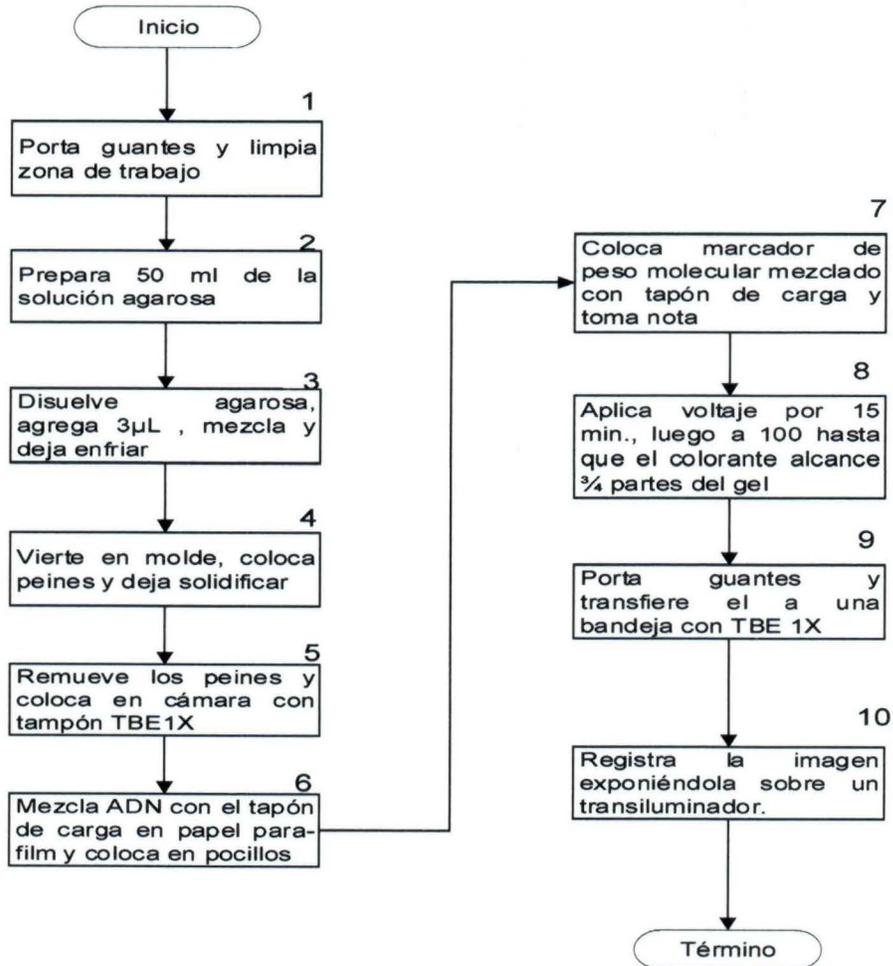
7.- Evaluación de la integridad del DNA por electroforesis

PERSONAL QUE INTERVIENE	ACT. No.	DESCRIPCIÓN
Investigadores, Químicos, Biólogos y Estudiantes capacitados de la Coordinación de Hematología Perinatal	1	Porta guantes y limpia zona de trabajo con desinfectante.
	2	Prepara 50 ml de la solución de agarosa al 2% en tampón TBE 1X (pesa 1.0 g de agarosa en un matraz de 250 ml, agrega 50 mL de TBE 1X y agita para mezclar).
	3	Disuelve la agarosa calentando hasta hervir en el microondas por 1 minuto evitando la evaporación, agrega 3 µL de Syber™ safe, mezcla y deja enfriar. (Nota: La solución de agarosa puede desbordarse muy fácilmente, así que no debe dejar de observarse; después de 20 segundos es bueno parar y agitar el matraz cuidando de no quemarse).
	4	Vierte la agarosa en el molde sin los peines, evita la formación de burbujas (en caso de que se formen, las remueve con una aguja), coloca los peines y deja solidificar a temperatura ambiente.
	5	Remueve los peines una vez solidificada la agarosa y coloca en la cámara de corrida con tampón TBE 1X.
	6	Mezcla 5 µL de la solución de ADN con 0.5 µL del tampón de carga 6X (azul de bromofenol y xileno cianol), en un trozo de papel parafilm fijado a la mesa, y coloca cada muestra en el pocillo correspondiente.
	7	Coloca el marcador de peso molecular 1.5 µL mezclado con tampón de carga 0.5 µL (azul de bromofenol y xileno cianol) y toma nota de la ubicación de sus muestras.
	8	Aplica un voltaje no superior a 75 Volts por 15 minutos y posteriormente deja correr a 100 volts hasta que el primer colorante alcance $\frac{3}{4}$ partes del gel.
	9	Porta guantes y al finalizar la corrida, transfiere el gel a una bandeja con TBE 1X
	10	Registra la imagen mediante la exposición sobre un transiluminador, utilizando un aparato de foto documentación.
		TERMINA PROCEDIMIENTO

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

7.- Evaluación de la integridad del DNA por electroforesis

Investigadores, Químicos, Biólogos y Estudiantes capacitados de la
Coordinación de Hematología Perinatal





DÍA	MES	AÑO
02	09	24

8- Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
(qPCR)

8.- Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

8- Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
(qPCR)

OBJETIVO ESPECÍFICO

Describir los pasos y la secuencia a seguir para el desarrollo de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real con sondas HybProbe y TaqMan, para que sirva de guía al personal que labora en la Coordinación de Hematología Perinatal.

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

8- Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
(qPCR)

POLÍTICAS DE OPERACIÓN

Será obligación del:

Coordinador/a de Hematología Perinatal:

- Seguir los procedimientos descritos en este manual técnico y notificar al responsable de la Coordinación de cualquier desviación que se presente durante el proceso.

Responsable de la Coordinación de Hematología Perinatal:

- o Supervisar que el personal conozca, entienda y aplique correctamente los procedimientos y coordine la capacitación del personal que efectúa la operación.

Nota: Este procedimiento aplica para los ensayos comerciales de sondas HybProbe® y TaqMan®.

8.- Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

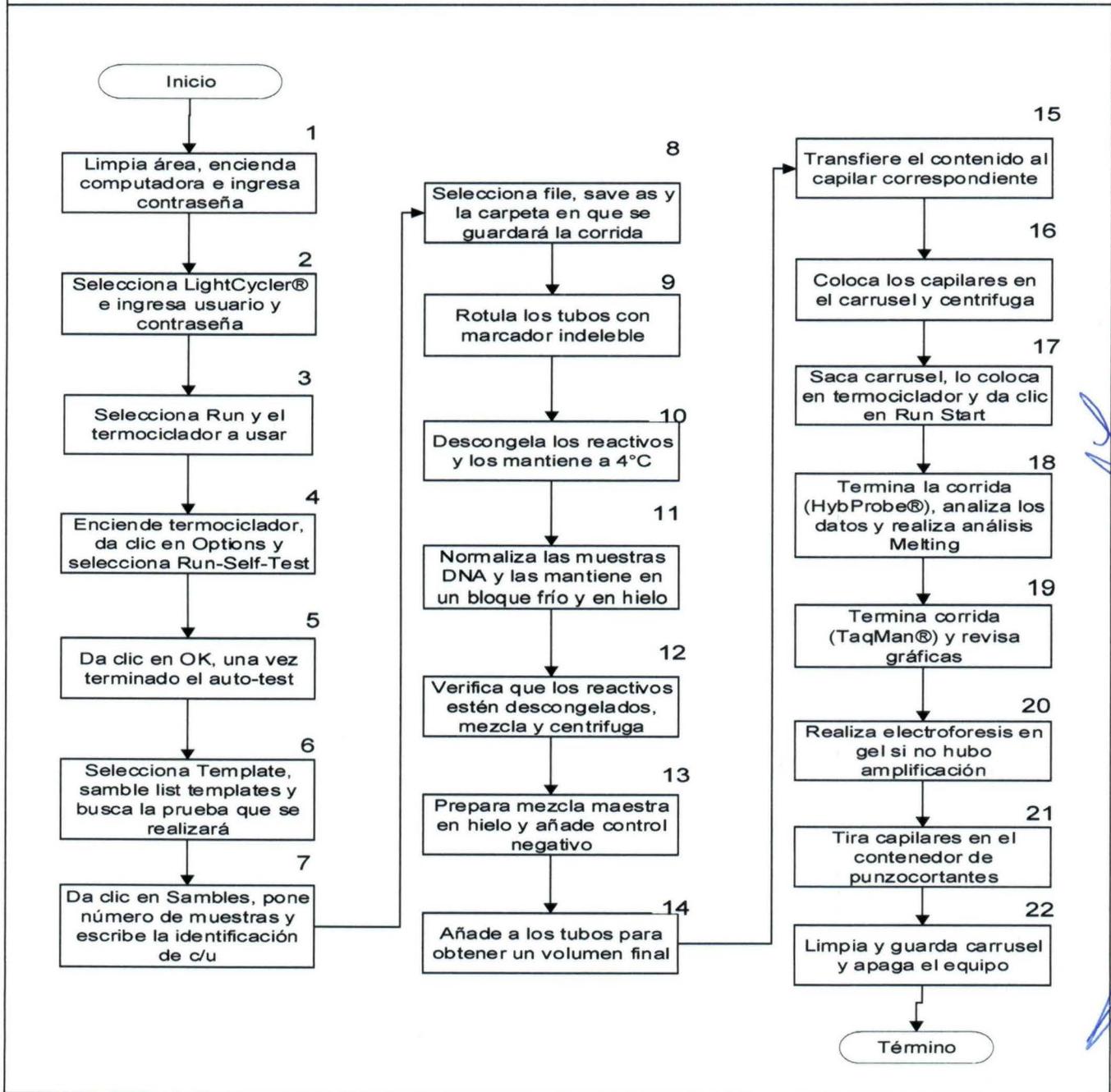
PERSONAL QUE INTERVIENE	No. Act.	Descripción de actividades
Investigadores, Químicos, Biólogos y Estudiantes capacitados de la Coordinación de Hematología Perinatal	Programación del termociclador (5 minutos)	
	1	Limpia el área de trabajo con alcohol al 70%, enciende la computadora, selecciona "admin" e ingresa la contraseña.
	2	Selecciona el icono LightCycler® Software 4.1 e ingresa usuario y contraseña.
	3	Selecciona "Run" y posteriormente selecciona el termociclador que se va a utilizar.
	4	Enciende el termociclador, da clic en "Options" y selecciona Run-Self-Test" (el termociclador debe estar cerrado antes de correr el auto-test).
	5	Da clic en el botón "OK" una vez terminado el auto-test y reconocido el equipo.
	6	Selecciona el icono "Template" (se abrirá otra ventana llamada "Apply templates"), después en "Sample List templates", despliega y busca la prueba que se realizara y da clic en "Open".
	7	Da clic en "Samples", pone el número de muestras y escribe la identificación de cada muestra.
	8	Selecciona "File", "Save as" y selecciona la carpeta en que se guardara la corrida.
	Preparación de la mezcla de reacción	
	9	Rotula los tubos con marcador indeleble.
	10	Descongela los reactivos (agua; Fast Start Master Mix (dNTP, Buffer, MgCl ₂ y Taq Polimerasa); sonda (Ancla y Sensor para HybProbe®; hidrólisis para TaqMan®); iniciador sentido e iniciador antisentido) y los mantiene a 4°C.
11	Normaliza las muestras de DNA a una concentración de 30 ng en un volumen de 2.0 (HybProbe®) ó 2.4µl (TaqMan®) (10ng/µl) en los tubos de reacción y mantiene las muestras en un bloque frío y en hielo.	
12	Verifica que los reactivos estén descongelados, mezcla y centrifuga antes de iniciar la preparación de la mezcla.	

8.- Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

PERSONAL QUE INTERVIENE	No. Act.	Descripción de actividades																														
Investigadores, Químicos, Biólogos y Estudiantes capacitados de la Coordinación de Hematología Perinatal	13	<p>Prepara la Mezcla Maestra <u>en hielo</u>, justo antes de utilizarla y añade un control negativo para evaluar la presencia de contaminación.</p> <p>Sondas HybProbe®</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Reactivos</th> <th>1 reacción (µL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Agua</td> <td>5.8</td> </tr> <tr> <td>Fast Start Master Mix</td> <td>1.0</td> </tr> <tr> <td>Sonda ancla</td> <td>0.2</td> </tr> <tr> <td>Sonda sensor</td> <td>0.2</td> </tr> <tr> <td>Iniciador sentido</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>Iniciador antisentido</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>8.0</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sondas TaqMan®</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Reactivos</th> <th>1 reacción (µL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Agua</td> <td>5.2</td> </tr> <tr> <td>Fast Start Master Mix</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Sonda TaqMan</td> <td>0.2</td> </tr> <tr> <td>Iniciador sentido</td> <td>0.1</td> </tr> <tr> <td>Iniciador antisentido</td> <td>0.1</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>7.6</td> </tr> </tbody> </table>	Reactivos	1 reacción (µL)	Agua	5.8	Fast Start Master Mix	1.0	Sonda ancla	0.2	Sonda sensor	0.2	Iniciador sentido	0.4	Iniciador antisentido	0.4	Total	8.0	Reactivos	1 reacción (µL)	Agua	5.2	Fast Start Master Mix	2	Sonda TaqMan	0.2	Iniciador sentido	0.1	Iniciador antisentido	0.1	Total	7.6
	Reactivos	1 reacción (µL)																														
	Agua	5.8																														
	Fast Start Master Mix	1.0																														
	Sonda ancla	0.2																														
	Sonda sensor	0.2																														
	Iniciador sentido	0.4																														
	Iniciador antisentido	0.4																														
	Total	8.0																														
	Reactivos	1 reacción (µL)																														
	Agua	5.2																														
	Fast Start Master Mix	2																														
	Sonda TaqMan	0.2																														
	Iniciador sentido	0.1																														
	Iniciador antisentido	0.1																														
	Total	7.6																														
	14	Añade 8.0 (HybProbe®) ó 7.6µl (TaqMan®) del Fast Start Master Mix a los tubos para obtener un volumen final de 10µl; asegurándose de mezclar bien la mezcla maestra.																														
	15	Transfiere el contenido de los tubos al capilar correspondiente.																														
	16	Coloca los capilares en el carrusel y centrifuga.																														
	17	Saca el carrusel de la centrifuga, lo coloca en el termociclador y da clic en la pestaña Run Start.																														
	18	Termina la corrida sondas HybProbe®, analiza los datos, revisa gráficas de adquisición y realiza el análisis Melting.																														
	19	Termina la corrida sondas TaqMan®, analiza los datos y revisa gráficas de adquisición.																														
20	Realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2% si no hubo amplificación.																															
21	Tira los capilares en el contenedor de punzocortantes.																															
22	Limpia el carrusel con gasas húmedas, después con gasas húmedas impregnadas con alcohol al 70°, seca bien, guarda el carrusel dentro del termociclador y apagar el equipo.																															
TERMINA PROCEDIMIENTO																																

8.- Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Investigadores, Químicos, Biólogos y Estudiantes capacitados de la
Coordinación de Hematología Perinatal



DÍA	MES	AÑO
02	09	24

9.- Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

9.- Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

9.- Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

OBJETIVO

Describir los pasos y la secuencia a seguir para el desarrollo del Protocolo: Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que sirva de guía para el personal que labora en la Coordinación de Hematología Perinatal, como para el conocimiento del personal del Instituto.



DÍA	MES	AÑO
02	09	24

9.- Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

POLÍTICAS DE OPERACIÓN

Será obligación del:

Coordinador/a de Hematología Perinatal:

- Seguir los procedimientos descritos en este manual y verificar cualquier desviación que se presente durante el proceso.
- Supervisar que el personal conozca, entienda y aplique correctamente los procedimientos y coordinar la capacitación del personal que efectúa la operación.

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

9.- Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

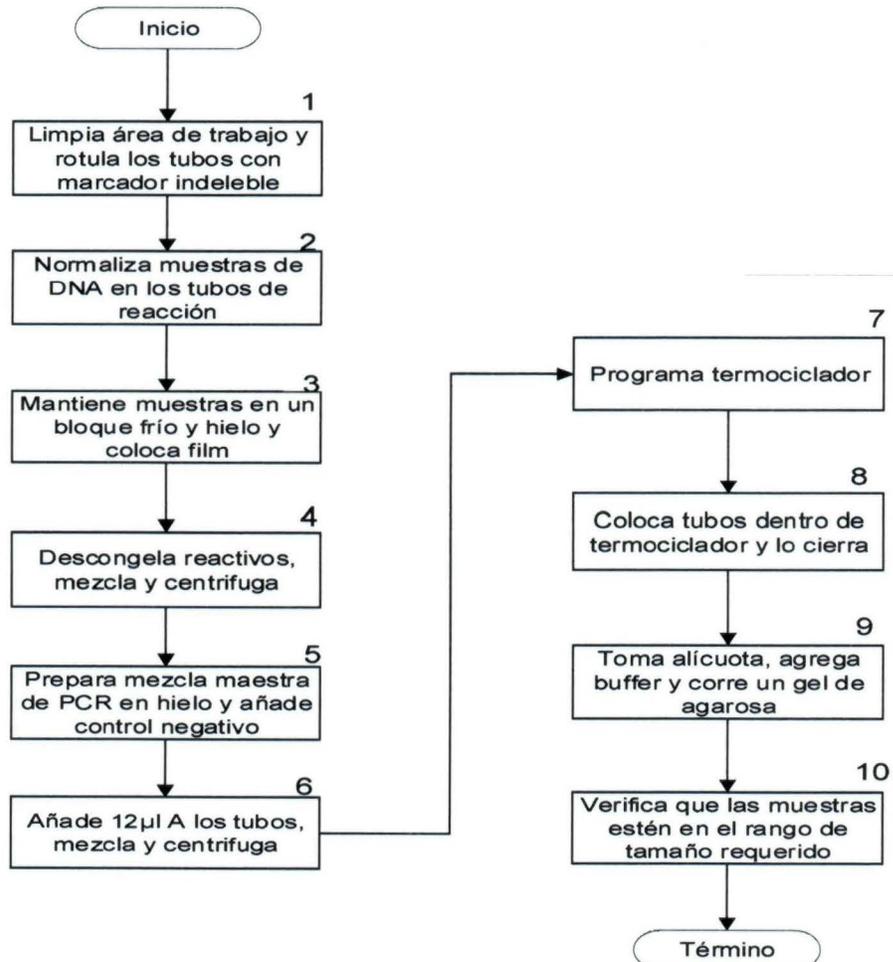
PERSONAL QUE INTERVIENE	No. Act.	Descripción de actividades																		
Profesional de laboratorio	Preparación de la Muestra (3 hrs.)																			
	1	Limpia el área de trabajo con alcohol al 70% y rotula los tubos con marcador indeleble.																		
	2	Normaliza las muestras de DNA a una concentración de 150 ng en un volumen de 3µl (50ng/µl) en los tubos de reacción o placa de 96 pozos.																		
	3	Mantiene las muestras en un bloque frío y en hielo, y coloca un film sobre la placa para protegerla de la contaminación.																		
	4	Descongela los reactivos (hot start master mix, iniciador sentido, iniciador anti-sentido y agua), los mantiene a 4°C, mezcla y centrifuga antes de iniciar la preparación.																		
	5	Prepara la Mezcla Maestra (Master Mix) de PCR <u>en hielo</u> , justo antes de utilizarla y añade un control negativo para evaluar la presencia de contaminación.																		
		<table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Reactivos</th> <th>1 reacción (µL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Agua</td> <td>3.9</td> </tr> <tr> <td>HotStarTaq Master Mix buffer</td> <td>7.5</td> </tr> <tr> <td>Iniciador sentido (100µM)</td> <td>0.3</td> </tr> <tr> <td>Iniciador anti-sentido (100µM)</td> <td>0.3</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table>	Reactivos	1 reacción (µL)	Agua	3.9	HotStarTaq Master Mix buffer	7.5	Iniciador sentido (100µM)	0.3	Iniciador anti-sentido (100µM)	0.3	Total	12						
	Reactivos	1 reacción (µL)																		
	Agua	3.9																		
	HotStarTaq Master Mix buffer	7.5																		
Iniciador sentido (100µM)	0.3																			
Iniciador anti-sentido (100µM)	0.3																			
Total	12																			
6	Añade 12µl del PCR Master Mix a los tubos o placa (para obtener un volumen final de 15µl), mezcla la reacción en un vortex durante 3 segundos y luego centrifuga a 2000 rpm durante 1 min.																			
7	Programa el termociclador de la siguiente forma: <table border="1" style="width: 100%; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th>Temperatura</th> <th>Tiempo</th> <th>Ciclos</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>95°C</td> <td>15 minutos</td> <td>1X</td> </tr> <tr> <td>94°C</td> <td>30 segundos</td> <td rowspan="3">35X</td> </tr> <tr> <td>65°C</td> <td>45 segundos</td> </tr> <tr> <td>72°C</td> <td>60 segundos</td> </tr> <tr> <td>72°C</td> <td>10 minutos</td> <td>1X</td> </tr> <tr> <td>4°C</td> <td>∞</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Si no procesa la muestra inmediatamente la guarda a 20°C.</p>	Temperatura	Tiempo	Ciclos	95°C	15 minutos	1X	94°C	30 segundos	35X	65°C	45 segundos	72°C	60 segundos	72°C	10 minutos	1X	4°C	∞	
Temperatura	Tiempo	Ciclos																		
95°C	15 minutos	1X																		
94°C	30 segundos	35X																		
65°C	45 segundos																			
72°C	60 segundos																			
72°C	10 minutos	1X																		
4°C	∞																			
8	Coloca los tubos dentro del termociclador y lo cierra.																			
9	Toma una alícuota de 3µl y agrega 3µl de buffer de muestra para gel de electroforesis y corre un gel de Agarosa/TBE al 2% a 120V durante 50 minutos.																			
10	Verifica que las muestras estén en el rango de tamaño requerido (1500-200pb).																			
		TERMINA PROCEDIMIENTO																		

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

9.- Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Profesional de laboratorio

Preparación de la Muestra (3 hrs.)





HOJA 1		
FECHA		
DÍA	MES	AÑO
02	09	24

10.- Técnica de secuenciación automática tipo sanger

10.- Técnica de secuenciación automática tipo sanger

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

10.- Técnica de secuenciación automática tipo sanger

OBJETIVO ESPECÍFICO

Describir los pasos y la secuencia a seguir para el desarrollo del Protocolo de la técnica de secuenciación automática tipo Sanger, que sirva de guía para el personal que labora en la Coordinación de Hematología Perinatal, como para el conocimiento del personal del Instituto.

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

10.- Técnica de secuenciación automática tipo sanger

POLÍTICAS DE OPERACIÓN

Será obligación del:

Coordinador/a de Hematología Perinatal:

- Supervisar que el personal conozca, entienda y aplique correctamente los procedimientos y coordine la capacitación del personal que efectúa la operación.

Personal de Laboratorio

- Seguir los procedimientos descritos en este manual y notificar al responsable de la Coordinación de cualquier desviación que se presente durante el proceso.

Nota: Las muestras se limpian para eliminar todos los nucleótidos marcados con fluorescencia que no se incorporaron en la reacción de Big Dye. Existen varios métodos para eliminar estos nucleótidos. Pueden removerse por precipitación con Etanol, por filtración en membrana, perlas magnéticas o por columnas de Sephadex (Columnas Centrisep).

10.- Técnica de secuenciación automática tipo sanger

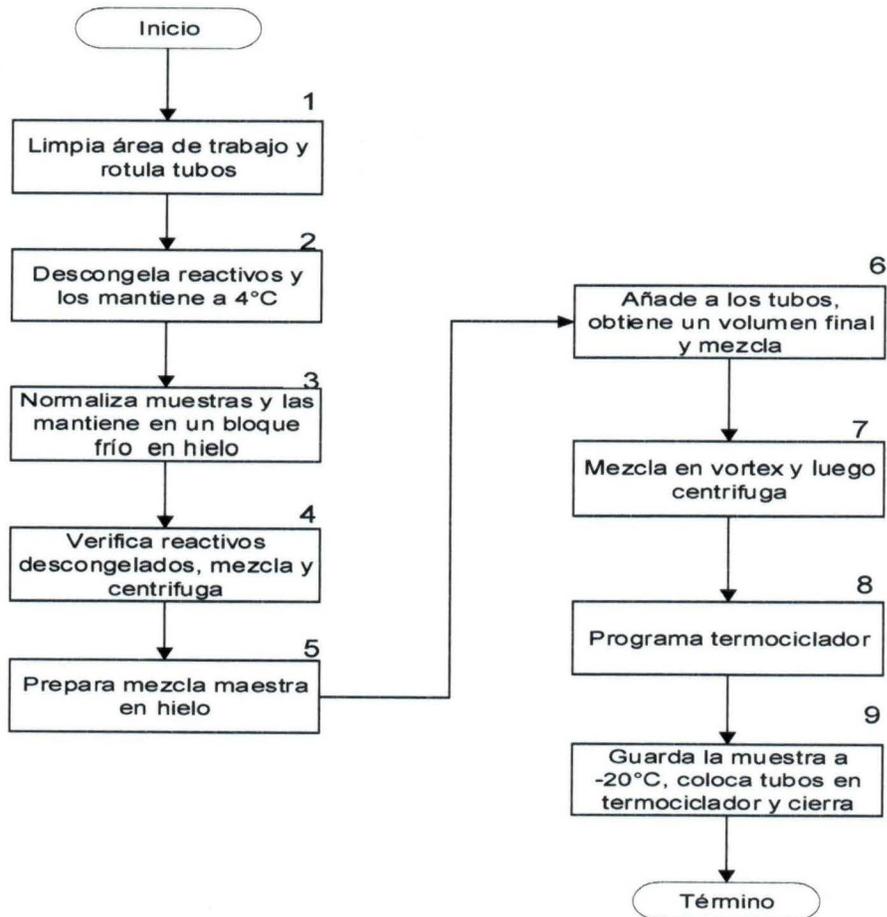
PERSONAL QUE INTERVIENE	No. Act.	Descripción de actividades												
Profesional de laboratorio		Preparación de la Muestra (3 hrs.)												
	1	Limpia el área de trabajo con alcohol al 70% y rotula los tubos con marcador indeleble.												
	2	Descongela reactivos (big Dye Terminator V3.1; buffer de secuencia 5X; iniciadores sentido y antisentido y agua) y los mantiene a 4°C.												
	3	Normaliza las muestras de DNA a una concentración de 150 ng en un volumen de 3µl (50ng/µl) en los tubos de reacción o placa de 96 pozos; mantiene las muestras en un bloque frío y en hielo, y coloca un film sobre la placa para protegerla de la contaminación.												
	4	Verifica que los reactivos estén descongelados, mezcla y centrifuga antes de iniciar la preparación.												
	5	Prepara Mezcla Maestra (Master Mix) de Big Dye <u>en hielo</u> , justo antes de utilizarla (añade un control negativo para evaluar la presencia de contaminación).												
		<table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Reactivos</th> <th>1 reacción (µL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Agua</td> <td>2.5</td> </tr> <tr> <td>Big Dye Terminator 3.1®</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>Iniciador sentido (100µM)</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>Big Dye Terminator Buffer (5X).</td> <td>3.5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Total</td> <td style="text-align: center;">7</td> </tr> </tbody> </table>	Reactivos	1 reacción (µL)	Agua	2.5	Big Dye Terminator 3.1®	0.5	Iniciador sentido (100µM)	0.5	Big Dye Terminator Buffer (5X).	3.5	Total	7
	Reactivos	1 reacción (µL)												
	Agua	2.5												
Big Dye Terminator 3.1®	0.5													
Iniciador sentido (100µM)	0.5													
Big Dye Terminator Buffer (5X).	3.5													
Total	7													
6	Añade 3µl de Big Dye Master Mix a los tubos o placa, obtiene un volumen final de 10µl y mezcla bien.													
7	Mezcla la reacción en un vortex durante 3 segundos y luego centrifuga a 2000 rpm, durante 1 min.													
8	Programa el termociclador de la siguiente forma: <table border="1" style="width: 100%; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th>Temperatura</th> <th>Tiempo</th> <th>Ciclos</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>95°C</td> <td>30 segundos</td> <td rowspan="4" style="vertical-align: middle;">25X</td> </tr> <tr> <td>50°C</td> <td>15 segundos</td> </tr> <tr> <td>60°C</td> <td>4 minutos</td> </tr> <tr> <td>4°C</td> <td>∞</td> </tr> </tbody> </table>	Temperatura	Tiempo	Ciclos	95°C	30 segundos	25X	50°C	15 segundos	60°C	4 minutos	4°C	∞	
Temperatura	Tiempo	Ciclos												
95°C	30 segundos	25X												
50°C	15 segundos													
60°C	4 minutos													
4°C	∞													
9	Guarda la muestra a -20°C (si no la procesa inmediatamente), coloca los tubos dentro del termociclador y lo cierra.													
Termina procedimiento														

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

10.- Técnica de secuenciación automática tipo sanger

Profesional de laboratorio

Preparación de la Muestra (3 hrs.)



10.- Técnica de secuenciación automática tipo sanger

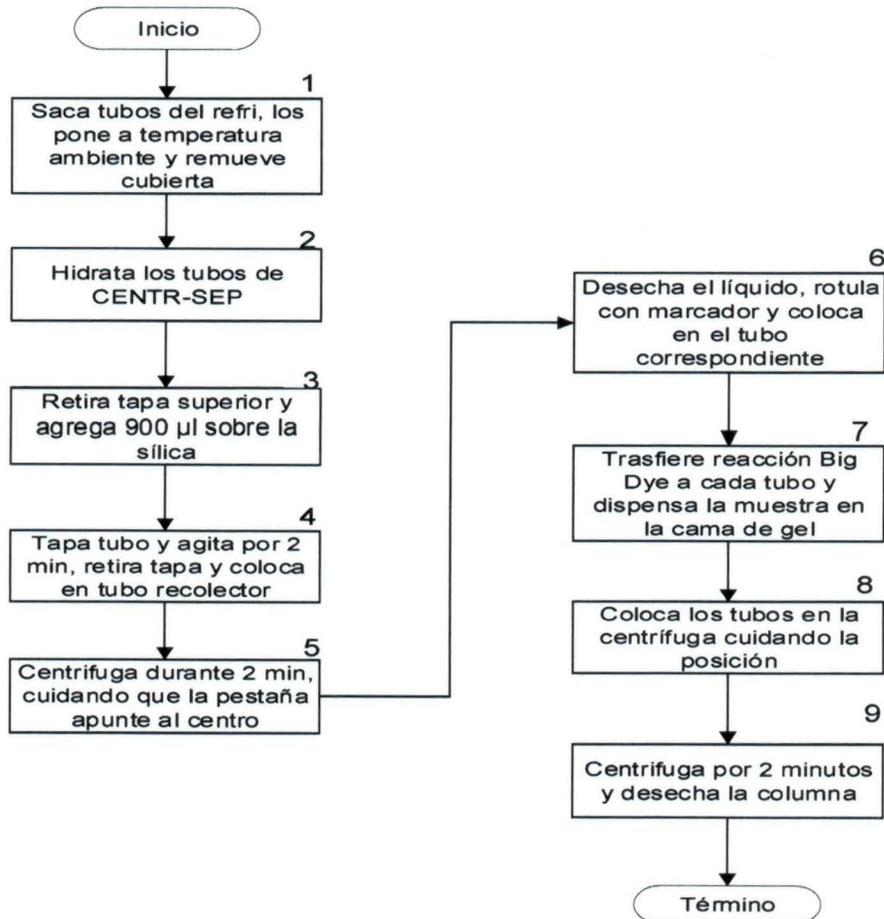
PERSONAL QUE INTERVIENE	No. Act.	Descripción de actividades
Profesional de laboratorio	Purificación de reacciones de PCR (30 min) Método Columnas CentriSep	
	1	Saca los tubos o la placa del refrigerador (productos de la reacción de Big Dye), los pone a temperatura ambiente y remueve la cubierta.
	2	Hidrata los tubos de CENTR-SEP.
	3	Retira la tapa superior y agrega 900 µl sobre la sílica, evitando tocar la superficie.
	4	Tapa el tubo y agita por 2 minutos, retira la tapa inferior y coloca el tubo en un tubo colector.
	5	Centrifuga a 5,700rpm durante 2 minutos, cuidando que la pestaña del tubo que contiene la columna apunte al centro del rotor.
	6	Desecha el líquido (200µl), rotula con marcador indeleble los tubos de 1.5ml donde se coleccionará la muestra y coloca la columna en el tubo correspondiente.
	7	Transfiere 20µl de la reacción de Big Dye a cada tubo y dispensa la muestra en el centro de la cama del gel sin hacer contacto en la superficie del gel o en los lados.
	8	Coloca los tubos en la centrifuga cuidando que la pestaña del tubo de la columna quede en la misma posición en la que se centrifugo la primera vez.
9	Centrifuga a 5,700rpm durante 2 minutos (la muestra purificada se ira al fondo del tubo colector) y desecha la columna.	
		Termina procedimiento

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

10.- Técnica de secuenciación automática tipo sanger

Profesional de laboratorio

Purificación de reacciones de PCR (30 min)
Método Columnas CentriSep



10.- Técnica de secuenciación automática tipo sanger

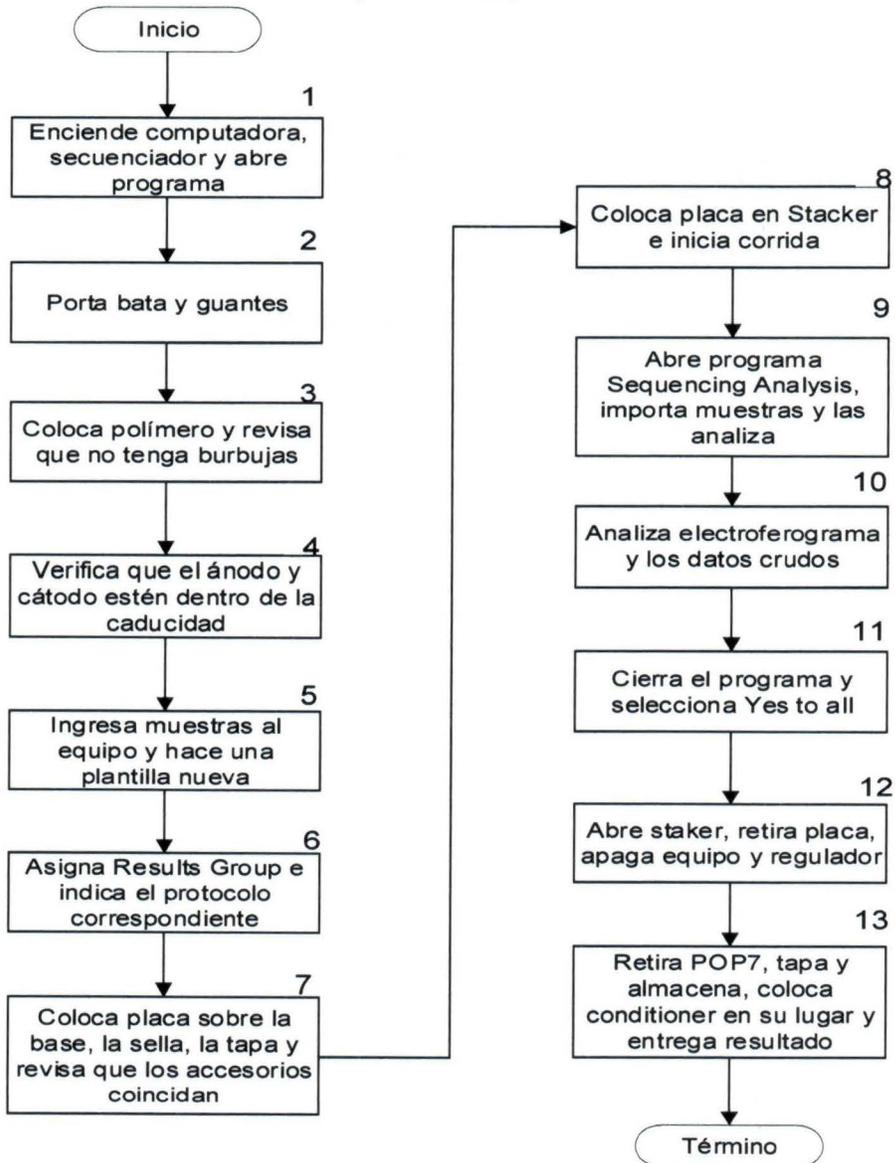
PERSONAL QUE INTERVIENE	No. Act.	Descripción de actividades
Profesional de laboratorio		Procesamiento de las muestras en el equipo (2hrs 20 min)
	1	Enciende la computadora, el secuenciador y abre el programa Run 3500xl.
	2	Porta bata y guantes (obligatorio) para su seguridad.
	3	Coloca el polímero POP7 en el equipo y revisa que todos los conductos y la bomba de zafiro se encuentren sin burbujas; de ser el caso las remueve con el bubble remove wizard.
	4	Verifica que los amortiguadores del ánodo y cátodo estén dentro de la caducidad, antes de realizar una corrida.
	5	Ingresa las muestras al equipo dentro del rubro Plate Manager y hace una platilla nueva (New), indicando siempre la orientación del primer (F para Forward y R para Reverse).
	6	Asigna Results Group según sea el usuario, indica Instrument Protocol correspondiente (ejemplo: Fast Sequence para el 3730xl y Rapid Sequence para el 3130x), y asigna el Analysis Protocol: 3130POP7BDTV1-KB o 3730POP7BDTV3.1-De Novo.
	7	Coloca la placa sobre la base (accesorio del equipo), la sella con una septa, la tapa con un retainer y revisa que todos los orificios de la placa y de los accesorios coincidan perfectamente para evitar daño a los capilares.
	8	Coloca la placa en el Stacker del equipo e inicia la corrida en el rubro Run Scheduler.
	9	Abre el programa Sequencing Analysis V5.2 al terminar la corrida, importa muestras y las analiza seleccionando los parámetros BC y PP en cada una.
	10	Analiza el electroferograma (Electropherogram) y los datos crudos (Raw) de cada muestra, poniendo atención en la asignación de bases, calidad de asignación y fluorescencia de fondo.
	11	Cierra el programa y secciona "Yes to all" en cuanto aparezca la leyenda "Save samples?".
	12	Abre el staker, retira la placa, cierra todas las aplicaciones, apaga el equipo, la computadora y el regulador de alto voltaje.
13	Retira el POP7, lo tapa y almacena a 4°C, coloca conditioner en su lugar y entrega el resultado.	
		Termina procedimiento

DÍA	MES	AÑO
02	09	24

10.- Técnica de secuenciación automática tipo sanger

Profesional de laboratorio

Procesamiento de las muestras en el equipo
(2hrs 20 min)



DÍA	MES	AÑO
02	09	24

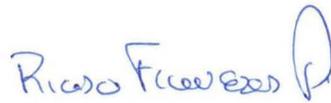
COORDINACIÓN DE HEMATOLOGIA PERINATAL

AUTORIZÓ



Dr. Enrique Reyes Muñoz
Director de Investigación

REVISÓ



Dr. Ricardo Figueroa Damián
Subdirector de Investigación Clínica

ELABORÓ



QBP. Rocío Trueba Gómez
Coordinadora de Hematología Perinatal

