

Conservación y manipulación



El kit deberá conservarse en el congelador a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Los viales de las sondas y de la tinción de contraste se deberán conservar en la oscuridad.



La sonda conserva su estabilidad durante los ciclos de congelación y descongelación que se experimentan durante el uso normal (la extracción de la sonda del congelador constituiría el primer ciclo y su reposición en el congelador, el segundo) y es fotoestable hasta 48 horas después de haberse expuesto a condiciones de luz continua. Deberá hacerse todo lo posible por limitar la exposición a la luz y los cambios de temperatura.

Equipos y materiales necesarios pero no suministrados

Se deberán utilizar los siguientes equipos calibrados:

1. Placa calentadora (con una placa sólida y control de temperatura de hasta 80 °C)
2. Micropipetas calibradas de distintos volúmenes y puntas de 1 µl a 200 µl
3. Baño María con control de temperatura de precisión a 37 °C y 72 °C
4. Tubos de microcentrifuga (0,5 ml)
5. Microscopio de fluorescencia (véase el apartado Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia)
6. Microscopio de contraste de fases
7. Frascos Coplin transparentes de plástico, cerámica o vidrio termorresistente
8. Pinzas
9. Medidor de pH calibrado (o tiras indicadoras de pH capaces de medir un pH de 6,5-8,0)
10. Recipiente humidificado
11. Aceite de inmersión para lentes de microscopio de fluorescencia
12. Centrifuga de sobremesa
13. Portaobjetos para microscopio
14. Cubreobjetos de 24 x 24 mm
15. Cronómetro
16. Incubadora de 37 °C
17. Adhesivo de solución de caucho
18. Mezclador vórtex
19. Cilindros graduados
20. Agitador magnético
21. Termómetro calibrado

Equipo opcional no suministrado

1. Cámara de secado citogenético

Reactivos necesarios pero no suministrados

1. Disolución de 20xSSC (citrato de sodio salino)
2. Etanol al 100 %
3. Tween-20
4. 1 M de hidróxido de sodio (NaOH)
5. 1M de ácido clorhídrico (HCl)
6. Agua purificada

Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia

Para una visualización óptima, se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 100 vatios o equivalente y objetivos planos apocromáticos de 60/63 o 100 aumentos con aceite de inmersión. Los fluoróforos utilizados en esta sonda se excitarán y emitirán energía a las siguientes longitudes de onda:

Fluoróforo	Excitación _{máx} [nm]	Emisión _{máx} [nm]
Verde	495	521
Rojo	596	615

Asegúrese de colocar en el microscopio los filtros de excitación y emisión adecuados para cubrir las longitudes de onda mencionadas más arriba. Para una óptima visualización simultánea de los fluoróforos verde y rojo, se recomienda utilizar un filtro de paso de banda triple DAPI/espectro verde/espectro rojo o un filtro de paso de banda doble espectro verde/espectro rojo.

Se deberá comprobar el microscopio de fluorescencia antes de su uso para confirmar que funciona correctamente. El aceite de inmersión deberá ser adecuado para la microscopía de fluorescencia y presentar baja autofluorescencia. Deberá evitarse la mezcla de DAPI AntiFade con aceite de inmersión para microscopio, puesto que esto oscurecerá las señales. Se deberán seguir las recomendaciones de los fabricantes relativas a la vida útil de la lámpara y la antigüedad de los filtros.

Preparación de las muestras

El kit está diseñado para utilizarse en suspensiones de células de origen hematológico fijadas en solución fijadora de Carnoy (3:1 metanol/ácido acético), que se deberá preparar de acuerdo con las directrices del laboratorio o el centro. Se han de preparar muestras secadas al aire en portaobjetos para microscopio de acuerdo con los procedimientos citogenéticos habituales. La guía *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* contiene recomendaciones sobre la recogida, el cultivo y la extracción de muestras y la preparación de los portaobjetos⁷.

Preparación de las disoluciones

Soluciones de etanol

Diluya etanol al 100 % con agua purificada utilizando las siguientes proporciones y mézclelo bien:

- Etanol al 70 %: 7 partes de etanol al 100 % por 3 partes de agua purificada
 - Etanol al 85 %: 8,5 partes de etanol al 100 % por 1,5 partes de agua purificada
- Conserve las disoluciones hasta seis meses a temperatura ambiente en un recipiente hermético.

Solución 2xSSC

Diluya 1 parte de disolución de 20xSSC en 9 partes de agua purificada y mézclelo bien. Compruebe el pH y regule a 7,0 utilizando NaOH o HCl según sea necesario. Conserve la disolución hasta 4 semanas a temperatura ambiente en un recipiente hermético.

Solución de 0,4xSSC

Diluya 1 parte de disolución de 20xSSC en 49 partes de agua purificada y mézclelo bien. Compruebe el pH y regule a 7,0 utilizando NaOH o HCl según sea necesario. Conserve la disolución hasta 4 semanas a temperatura ambiente en un recipiente hermético.

Solución de 2xSSC y Tween-20 al 0,05 %

Diluya 1 parte de disolución de 20xSSC en 9 partes de agua purificada. Añada 5 µl de Tween-20 por cada 10 ml y mézclelo bien. Compruebe el pH y regule a 7,0 utilizando NaOH o HCl según sea necesario. Conserve la disolución hasta 4 semanas a temperatura ambiente en un recipiente hermético.

Protocolo FISH

(Nota: Asegúrese de limitar la exposición de la sonda y la tinción de contraste a la luz del laboratorio en todo momento).

Preparación de los portaobjetos

1. Deposite la muestra celular en un portaobjetos para microscopio de vidrio. Deje que se seque. **(Opcional, si se utiliza una cámara de secado citogenético:** se deberán depositar las muestras en los portaobjetos utilizando una cámara de secado citogenético. Para un depósito óptimo de las muestras celulares, la cámara deberá funcionar a aproximadamente 25 °C con una humedad del 50 %. Si no dispone de una cámara de secado citogenético, utilice una campana de laboratorio en su lugar).
2. Sumerja el portaobjetos en 2xSSC durante 2 minutos a temperatura ambiente sin agitación.
3. Deshidrátelo en mezclas progresivas de etanol (70 %, 85 % y 100%), durante 2 minutos en cada una a temperatura ambiente.
4. Deje que se seque.

Antes de la desnaturalización

5. Saque la sonda del congelador y deje que alcance la temperatura ambiente. Centrifugue brevemente los tubos antes de su uso.
6. Mezcle uniformemente la disolución de la sonda con una pipeta.
7. Extraiga 10 µl de sonda por cada ensayo y transfíralos a un tubo de microcentrifuga. Devuelva sin demora el resto de la sonda al congelador.
8. Coloque la sonda y el portaobjetos con la muestra sobre una placa calefactora a 37 °C (+/- 1 °C) para precalentarlos durante 5 minutos.
9. Deposite 10 µl de mezcla de sonda sobre la muestra celular y coloque con cuidado un cubreobjetos. Selle con adhesivo de disolución de caucho y deje que se seque completamente.

Desnaturalización

10. Desnaturalice simultáneamente la muestra y la sonda calentando el portaobjetos en una placa calefactora a 75 °C (+/- 1 °C) durante 2 minutos.

Hibridación

11. Coloque el portaobjetos en un recipiente húmedo y opaco a 37 °C (+/- 1 °C) toda la noche.

Lavados después de la hibridación

12. Saque el DAPI del congelador y deje que alcance la temperatura ambiente.
13. Retire con cuidado el cubreobjetos y cualquier resto de adhesivo.
14. Sumerja el portaobjetos en disolución de 0,4xSSC (pH de 7,0) a 72 °C (+/- 1 °C) durante 2 minutos sin agitación.
15. Escurra el portaobjetos y sumérgalo en disolución de 2xSSC y Tween-20 al 0,05 % a temperatura ambiente (pH de 7,0) durante 30 segundos sin agitación.
16. Escurra el portaobjetos y aplique 10 µl de DAPI AntiFade sobre cada muestra.
17. Cubra con un cubreobjetos, elimine las posibles burbujas y deje que el color se revele en la oscuridad durante 10 minutos.
18. Observe con un microscopio de fluorescencia (véase el apartado **Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia**).

Estabilidad de los portaobjetos terminados

Los portaobjetos terminados se pueden analizar durante 1 mes si se conservan en un lugar oscuro a temperatura ambiente o inferior.

Recomendaciones sobre el procedimiento

1. El sobrecalentamiento o el envejecimiento de los portaobjetos pueden reducir la fluorescencia de la señal.
2. El uso de reactivos distintos a los suministrados o recomendados por Cytocel Ltd. puede afectar negativamente a las condiciones de hibridación.
3. Se recomienda usar un termómetro calibrado para medir las temperaturas de las disoluciones, los baños María y las incubadoras, ya que estas temperaturas son cruciales para el funcionamiento óptimo del producto.

- Las concentraciones, el pH y las temperaturas de los lavados son importantes, puesto que su aplicación laxa puede provocar una unión no específica de la sonda, mientras que una aplicación excesivamente restrictiva puede derivar en la falta de señal.
- Una desnaturalización incompleta puede ocasionar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede redundar en una unión no específica.
- La hibridación excesiva puede dar lugar a señales adicionales o inesperadas.
- Los usuarios deberán optimizar el protocolo de sus muestras antes de utilizar el ensayo con fines diagnósticos.
- Unas condiciones deficientes podrían producir una unión no específica, la cual podría malinterpretarse como una señal de la sonda.

Interpretación de los resultados

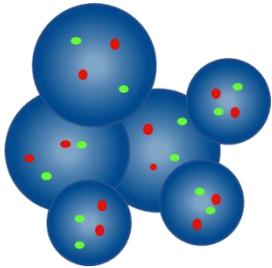
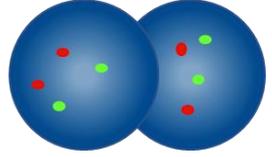
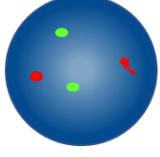
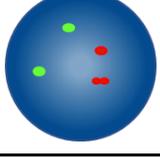
Evaluación de la calidad del portaobjetos

El portaobjetos no se deberá analizar si se dan las siguientes condiciones:

- Las señales son demasiado débiles para analizarse con un solo filtro: para proceder a realizar el análisis, las señales deberán mostrarse intensas, distinguirse y evaluarse con facilidad.
- Hay una gran cantidad de células aglomeradas o superpuestas que dificultan el análisis.
- Más del 50 % de las células no se ha hibridado.
- Hay un exceso de partículas fluorescentes entre las células o un halo fluorescente que interfiere con la señal: en los portaobjetos óptimos, el fondo deberá aparecer despejado y de un color oscuro o negro.
- Los bordes del núcleo celular no se pueden distinguir y no se muestran intactos.

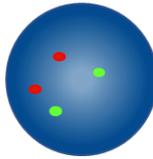
Pautas para el análisis

- Cada muestra deberá ser analizada e interpretada por dos analistas. Cualquier discrepancia deberá resolverse mediante la valoración de un tercer analista.
- Cada analista deberá estar debidamente cualificado según los criterios nacionales reconocidos.
- Cada analista deberá puntuar de manera independiente 100 núcleos de cada muestra. El primer analista deberá comenzar el análisis por el lado izquierdo del portaobjetos y el segundo analista, por el lado derecho.
- Cada analista deberá documentar sus resultados en fichas separadas.
- Únicamente se deberán analizar los núcleos intactos: ni los núcleos superpuestos o aglutinados ni los núcleos cubiertos por restos citoplasmáticos o con un alto grado de autofluorescencia.
- Se han de evitar las zonas en las que se observe un exceso de restos citoplasmáticos o una hibridación no específica.
- La intensidad de la señal puede variar, incluso en un mismo núcleo. En esos casos, se deberá utilizar un solo filtro o ajustar el plano focal.
- En condiciones que no son óptimas, las señales pueden aparecer difusas. Los casos en que dos señales del mismo color se toquen, la distancia entre ellas sea inferior al ancho de dos señales o se perciba un tenue filamento que las conecte, contabilizarán como una sola señal.
- Se habrán de descartar todas aquellas células cuyo análisis planteen dudas.

Pautas para el análisis	
	No se contabilizan: los núcleos están demasiado próximos para determinar los límites.
	Los núcleos que se superponen no se contabilizan: no todas las zonas de los dos núcleos son visibles.
	Se contabilizan como dos señales rojas y dos señales verdes: una de las dos señales rojas es difusa.
	Se contabilizan como dos señales rojas y dos señales verdes: la separación en una de las señales rojas es inferior al ancho de dos sondas.

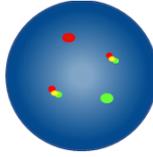
Resultados previstos

Patrón previsto de señales normales



En una célula normal, se espera observar dos señales rojas y dos señales verdes (2 R, 2 V).

Patrón previsto de señales anómalas



En una célula con una translocación t(14;16)(q32.3;q23), el patrón de señal previsto es de una señal roja, una señal verde y dos señales de fusión (1 R, 1 V, 2 F).

Es posible observar otros patrones de señales en muestras aneuploides o no equilibradas. Asimismo, deberá tenerse en cuenta que, en presencia de otros reordenamientos con el gen IgH distintos de la translocación IgH/MAF, la señal IgH verde puede aparecer dividida.

Reactividad cruzada conocida

Es posible que la sonda IgH verde muestre hibridación cruzada en los cromosomas 15q11.2 y 16p11.2.

Notificación de acontecimientos adversos

Si cree que este producto ha funcionado incorrectamente o ha sufrido un deterioro de sus características de rendimiento que haya podido contribuir a que se produzca un acontecimiento adverso (como, por ejemplo, el retraso en un diagnóstico o un diagnóstico erróneo, el retraso en un tratamiento o un tratamiento inadecuado), deberá notificarlo de inmediato al fabricante (**correo electrónico:** vigilance@ogt.com).

Si corresponde, también deberá informar de lo sucedido a las autoridades competentes de su país. Se puede consultar una lista de puntos de contacto de vigilancia en la siguiente dirección: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Características específicas sobre el rendimiento

Especificidad analítica

La especificidad analítica se define como el porcentaje de señales que hibridan con el locus correcto y no con otros puntos. Se analizaron cuatro loci cromosómicos en cada una de las veinte metafases celulares de cinco muestras, que arrojaron 400 puntos de datos. Se localizó la ubicación de cada sonda hibridada y se registró el número de señales de FISH de metafase que hibridan con el locus correcto.

La especificidad analítica de cada sonda del kit se calculó como el número de señales de FISH de metafase que hibridan con el locus correcto dividido por el número total de señales de FISH de metafase hibridadas; el resultado se multiplicó por 100 expresado como porcentaje al que se asignó un intervalo de confianza del 95 %.

Tabla 1. Especificidad analítica de IgH/MAF v2 Translocation. Dual Fusion Probe

Locus de interés	Número de metafases cromosómicas hibridadas	Número de loci correctamente hibridados	Especificidad analítica	Intervalo de confianza del 95 %
14q32.3	200	200	100 %	98,12 % - 100 %
16q23	200	200	100 %	98,12 % - 100 %

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica es el porcentaje de células en interfase puntuables que presentan el patrón previsto de señales normales. Se analizaron un mínimo de 200 células en interfase de cada una de las 25 muestras de médula ósea de cariotipo normal fijado o muestras de médula ósea negativas para el reordenamiento del gen IgH, y 25 muestras celulares CD138+ negativas para el gen IgH, que resultaron en un mínimo de 5.000 núcleos por cada tipo de muestra. Los datos sobre sensibilidad se analizaron en base al porcentaje de células que mostraban un patrón de señales normal esperado y se expresaron como porcentaje con un intervalo de confianza del 95 %.

Tabla 2. Sensibilidad analítica de IGH/MAF v2 Translocation, Dual Fusion Probe

Tipo de muestra	Criterios de sensibilidad	Resultado de la sensibilidad
Médula ósea	>95 %	97,8 % ± 0,67 %
CD138+	>95 %	96,64 % ± 0,78 %

Caracterización de los valores de corte normales

El valor de corte normal se define como el porcentaje de células que presentan un patrón de señales con falso positivo en la que un individuo se consideraría normal y no compatible con un diagnóstico clínico. Se analizaron un mínimo de 200 células en interfase de cada una de las 25 muestras de médula ósea de cariotipo normal fijado o muestras de médula ósea negativas para el reordenamiento del gen IgH, y 25 muestras celulares CD138+ negativas para el gen IgH, que resultaron en un mínimo de 5.000 núcleos por cada tipo de muestra.

El valor de corte se determinó utilizando la función β inversa (BETAINV) en MS Excel. Se calculó como el porcentaje de células en interfase que presentaban un patrón de señales con falso positivo utilizando el límite superior de un intervalo de confianza unilateral del 95 % de la distribución binomial en una muestra de paciente normal.

Tabla 3. Caracterización de valores de corte normales de IGH/MAF v2 Translocation, Dual Fusion Probe

Tipo de muestra	Resultado del corte
Médula ósea	1,5 %
CD138+	1,5 %

Los laboratorios deberán verificar los valores de corte usando sus propios datos^{7b}.

Precisión

La precisión de este producto se ha medido como la precisión intradía (entre distintas muestras), la precisión interdía (entre distintos días) y la precisión entre lotes en un único centro (entre distintos lotes).

Para evaluar la precisión de este producto se utilizaron tres muestras: una muestra de médula ósea normal artificial (obtenida a partir de 25 muestras individuales), una muestra de CD138+ normal artificial (obtenida a partir de 28 muestras individuales) y una muestra de CD138+ levemente positiva (2 a 4 veces el valor de corte del producto, obtenida enriqueciendo la muestra CD138+ normal con un positivo conocido), que se utilizó para enfrentar al producto al valor de corte establecido.

Para determinar la precisión interdía y la intradía, se evaluaron las muestras a lo largo de cinco días consecutivos, y para determinar la precisión entre lotes se evaluaron tres lotes del producto en cuatro copias de las mismas muestras. Los resultados se presentaron como la concordancia general con la clase negativa pronosticada (para las muestras negativas).

Tabla 4. Reproducibilidad y precisión de IGH/MAF v2 Translocation, Dual Fusion Probe

Variable	Tipo de muestra	Concordancia
Precisión intradía a interdía	Médula ósea normal (negativa)	100 %
	CD138+ normal (negativa)	100 %
	CD138+ levemente positiva	100 %
Precisión entre lotes	Médula ósea normal (negativa)	100 %
	CD138+ normal (negativa)	100 %
	CD138+ levemente positiva	100 %

Rendimiento clínico

Para asegurar que el producto detecta los reordenamientos previstos, el rendimiento clínico se determinó en dos ensayos con muestras representativas de la población prevista para el producto: uno con muestras de CD138+ y otro con muestras de médula ósea. El tamaño de muestra de cada ensayo fue de veinte muestras con la población prevista: cinco muestras positivas IgH-MAF y quince muestras negativas IgH-MAF. Ninguna de las muestras se podía identificar y se aleatorizaron para prevenir sesgos en el análisis. Los resultados se compararon con el estado conocido de la muestra. La sonda identificó correctamente el estado de las muestras en todos los casos.

Los resultados de dichos ensayos se analizaron para obtener los valores correspondientes a la sensibilidad clínica, la especificidad clínica y la tasa de falso positivo (TFP) para señales positivas utilizando un abordaje unidimensional.

Tabla 5. Rendimiento clínico de IGH/MAF v2 Translocation, Dual Fusion Probe

Variable	Resultado
Sensibilidad clínica (tasa de verdaderos positivos, TVP)	97,3 %
Especificidad clínica (tasa de verdaderos negativos, TVN)	99,8 %
Tasa de falsos positivos (TFP) = 1 - especificidad	0,2 %

Información adicional

Para obtener información adicional sobre el producto, póngase en contacto con el departamento de asistencia técnica de CytoCell.

Teléfono: +44 (0)1223 294048

Correo electrónico: techsupport@cytozell.com

Página web: www.ogt.com

Bibliografía

1. Fonseca *et al.*, Cancer Res 2004;64:1546-1558
2. Walker *et al.*, Blood 2013;121(17):3413-3419
3. Chang H *et al.*, Leukemia 2007;21:1572-1574
4. Fonseca *et al.*, Leukemia 2009;23(12):2210-2221
5. Sawyer, Cancer Genetics 2011;204(1):3-12
6. Arsham, MS., Barch, M.J. and Lawce H.J. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
7. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
8. Wiktor AE, Dyke DLV, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16-23.

Guía de símbolos

REF	es: Número de catálogo
	es: Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	es: Código de lote
	es: Consulte las instrucciones de uso
	es: Fabricante
	es: Fecha de caducidad
	es: Límite de temperatura
	es: Manténgase alejado de la luz solar
	es: Contiene suficiente para <n> ensayos
	es: Contenido

Patentes y marcas comerciales

CytoCell es una marca comercial registrada de CytoCell Ltd.



CytoCell Ltd.
Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, Reino Unido
Teléfono: +44(0)1223 294048
Fax: +44(0)1223 294986
Correo electrónico: probes@cytozell.com
Sitio web: www.ogt.com