



A Sysmex Group Company



Instrucciones de uso (IFU)

REF: CE-LPA 001-S / CE-LPA 001 /
CE-LPA 001-30 / CE-LPA 001-50

Prenatal Enumeration Probe Kit



SOLO PARA USO PROFESIONAL



Más información y otros idiomas disponibles en ogt.com/IFU

Uso previsto

El kit de sondas de recuento prenatal CytoCell® es una prueba cualitativa y no automatizada de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) que se utiliza para detectar las regiones centroméricas alfa de los cromosomas Xp11.1-q11.1, las regiones alfa centroméricas de los cromosomas Yp11.1-q11.1 y 18p11.1-q11.1, y las regiones 13q14.2 y 21q22.1 en células fijadas en solución de Carnoy (metanol/ácido acético 3:1) derivadas de muestras de líquido amniótico, en el recuento de los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21 en embarazos de alto riesgo en los que se sospeche de síndrome de Turner, Patau, Edwards o de Down.

Indicaciones de uso

Este dispositivo está diseñado como complemento de otras pruebas clínicas y de laboratorio en vías de diagnóstico y atención clínica reconocidas, tales como el cribado ecográfico y los análisis bioquímicos, en las que el conocimiento del estado del número de copias de las regiones centroméricas de los cromosomas Xp11.1-q11.1 y 18p11.1-q11.1, así como de las regiones 13q14.2 y 21q22.1, sería importante para el tratamiento del paciente.

Limitaciones

Este dispositivo está diseñado para detectar material cromosómico que incluye las regiones centroméricas cubiertas por los clones verde, naranja y azul en el componente Sonda de Enumeración FAST FISH Prenatal X, Y, para los cromosomas X, Y y 18 respectivamente. Las ganancias o pérdidas genómicas fuera de estas regiones, o las pérdidas o ganancias parciales de estas regiones pueden no detectarse con este dispositivo.

Este dispositivo también está diseñado para detectar material cromosómico que incluye las regiones cromosómicas 13q14.2 y 21q22.1 cubiertas por los clones verde y naranja en el componente Sonda de Enumeración FAST FISH Prenatal 13 y 21. Es posible que este producto no detecte ganancias o pérdidas genómicas fuera de estas regiones, ni pérdidas o ganancias parciales de las mismas.

Este dispositivo no está destinado a: utilizarse como prueba diagnóstica independiente, prueba diagnóstica complementaria, cribado poblacional, análisis a pie de cama ni autodiagnóstico.

Este dispositivo no ha sido validado para tipos de muestras, tipos de enfermedades o fines distintos de los indicados en la finalidad prevista. Este dispositivo no ha sido validado para su uso en la detección de ganancias en los cromosomas X y/o Y.

Este dispositivo está previsto como complemento de otras pruebas analíticas diagnósticas, por lo que no se deberá iniciar ninguna acción terapéutica basada exclusivamente en el resultado de un ensayo de FISH.

La comunicación y la interpretación de los resultados de la técnica FISH deben correr a cargo de personal debidamente cualificado, de conformidad con las normas profesionales vigentes, y deben tener en cuenta otros resultados de pruebas relevantes, así como la información clínica y diagnóstica.

Este dispositivo está destinado exclusivamente al uso profesional en laboratorio. Si no se sigue el protocolo, el resultado se podría ver afectado y se podrían generar falsos positivos o falsos negativos.

Principios del ensayo

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN sobre cromosomas metafásicos o en núcleos interfásicos de muestras citogenéticas fijadas. En la técnica, que constituye un excelente

complemento de las técnicas citogenéticas clásicas, se emplean sondas de ADN que hibridan con cromosomas completos o secuencias únicas simples. Los últimos avances han hecho que esta valiosa técnica pueda aplicarse ahora como un instrumento de diagnóstico esencial en el análisis cromosómico prenatal, hematológico y anatomopatológico. Una vez fijado y desnaturalizado, el ADN de interés está preparado para hibridar con una sonda de ADN marcada con fluorescencia e igualmente desnaturalizada que contiene una secuencia complementaria. Tras la hibridación, se retira la sonda de ADN libre o sin unión específica y el ADN se contrae para su visualización. A continuación, se puede observar mediante microscopía de fluorescencia la sonda hibridada sobre el material de interés.

Información sobre las sondas

El análisis citogenético molecular desempeña un papel fundamental en la evaluación prenatal de los embarazos de alto riesgo, ya que permite identificar con precisión las anomalías cromosómicas y evaluar el riesgo de recurrencia. Las anomalías cromosómicas más frecuentes son las aneuploidías, definidas como un número anormal de copias de un cromosoma, y los individuos afectados suelen presentar trisomía (tres copias de un cromosoma) o monosomía (una sola copia de un cromosoma).¹ Entre las aneuploidías más conocidas y clínicamente significativas se encuentran las trisomías 13, 18 y 21, así como la monosomía X. Estas anomalías son factores importantes que contribuyen a los trastornos del desarrollo y a los resultados reproductivos adversos, y se encuentran entre las indicaciones más comunes para el diagnóstico prenatal invasivo.²

La trisomía 21 (síndrome de Down), la trisomía autosómica viable más frecuente, se caracteriza por un deterioro cognitivo, anomalías cardíacas congénitas y morbilidad multisistémica, y sigue siendo una indicación clave para las pruebas genéticas prenatales.^{3,4} La trisomía 13 (síndrome de Patau) se caracteriza por malformaciones cerebrales (holoprosencefalia), dismorfismo facial, anomalías oculares, polidactilia posaxial, malformaciones viscerales (cardiopatía) y retraso psicomotor grave.⁵ La trisomía 18 (síndrome de Edwards) se asocia con malformaciones congénitas graves, alta mortalidad perinatal y fenotipos ecográficos bien definidos, lo que subraya la necesidad de una detección prenatal precisa y una confirmación genética.^{6,7} La monosomía X (síndrome de Turner), también conocida como síndrome de hipoplasia ovárica congénita, es la anomalía cromosómica sexual más común en las mujeres y se debe a la ausencia total o parcial de un cromosoma X.⁸

El diagnóstico prenatal se ofrece en embarazos de alto riesgo con mayor riesgo de anomalías cromosómicas como la trisomía 13, 18, 21 y la monosomía X. La FISH es un método de citogenética molecular validado para la detección y enumeración rápidas del número de copias cromosómicas en núcleos interfásicos. La FISH permite la detección selectiva de aneuploidías comunes y proporciona resultados rápidos para apoyar la toma de decisiones clínicas, y se utiliza ampliamente en el diagnóstico moderno de aneuploidías, en particular cuando se requiere una confirmación rápida del estado del número de copias cromosómicas.^{9,10,11}

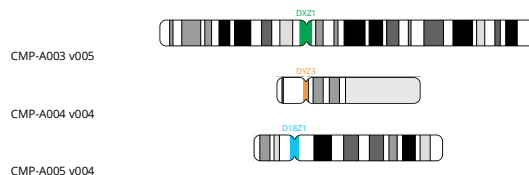
Características de las sondas

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Centrómero X, Xp11.1 - q11.1 (DXZ1) Verde

Centrómero Y, Yp11.1 - q11.1 (DYZ3) Naranja

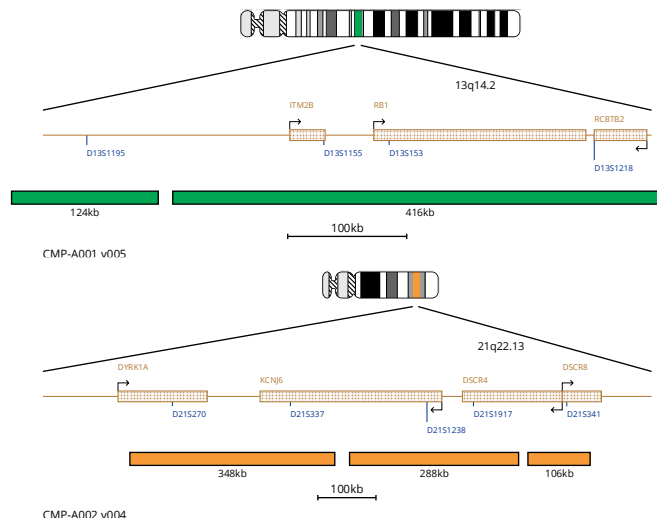
18 centrómero, 18p11.1 - q11.1 (D18Z1) Aqua



LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

13 secuencia única, 13q14.2 Verde

21 secuencia única, 21q22.13 Naranja



El kit contiene dos componentes de sonda para dos hibridaciones separadas.

LPA002

El componente de sonda LPA002 es una mezcla de sondas de ADN fluorescentes marcadas directamente en verde, naranja y agua:

- La sonda verde DXZ1 marca directamente las secuencias de ADN satélite alfa en la región DXZ1 del cromosoma X.
- La sonda naranja DYZ3 marca directamente las secuencias de ADN satélite alfa en la región DYZ3 del cromosoma Y.
- La sonda aqua D18Z1 marca directamente las secuencias de ADN satélite alfa en la región D18Z1 del cromosoma 18.

LPA003

El componente de sonda LPA003 es una mezcla de sondas de ADN fluorescentes marcadas directamente en verde y naranja que contienen secuencias únicas:

- La mezcla de sondas verdes contiene una sonda de 124kb y otra de 416kb en 13q14.2 que abarca los genes ITM2B, RB1 y RCBTB2, incluidos los marcadores D13S1195, D13S1155, D13S153 y D13S1218.
- La mezcla de sondas naranja contiene una sonda de 348kb, una sonda de 288kb y una sonda de 106kb en 21q22.13 que abarca los genes DYRK1A, KCNJ6, DSCR4 y DSCR8, incluidos los marcadores D21S270, D21S337, D21S1238, D21S1917 y D21S341.

Materiales suministrados

Sonda: 50µl por vial en kit de 5 pruebas, 100µl por vial en kit de 10 pruebas, 300µl por vial en kit de 30 pruebas, 500µl por vial en kit de 50 pruebas. Los componentes de la sonda se suministran premezclados en solución de hibridación (<65 % formamida; <20mg sulfato de dextrano; <10 % de 20x citrato salino-sódico (SSC)) y están listos para su uso.

Tinción de contraste: 150µl por vial en kit de 5 pruebas, 500µl por vial en kit de 10 pruebas, 1000µl por vial en kit de 30 pruebas, o 1200µl por vial en kit de 50 pruebas. La tinción de contraste es DAPI Antifade ES (0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) en medio de montaje a base de glicerol).

Advertencias y precauciones

1. Para uso diagnóstico *in vitro*. Exclusivamente para uso profesional en laboratorio.
2. Los operadores deben asegurarse de consultar y seguir en todo momento las instrucciones de uso correctas y más actualizadas.
3. Las mezclas de sondas contienen formamida, que es un teratógeno; no inhale los vapores ni permita que entren en contacto con la piel. Manipúlelo con precaución; utilice guantes y bata de laboratorio.
4. Manipule el DAPI con precaución; utilice guantes y bata de laboratorio.
5. No utilizar si el/los vial(es) está(n) dañado(s), o si el contenido del vial está comprometido de alguna manera.
6. Cumpla con las normas nacionales relativas a la eliminación de residuos y con las recomendaciones de la ficha de datos de seguridad para eliminar de forma segura este producto. Esto también se aplica al contenido dañado del kit de pruebas.
7. Elimine todos los reactivos usados y cualquier otro material desechable contaminado según los procedimientos para residuos infecciosos o potencialmente infecciosos. El laboratorio es el responsable de la manipulación de los residuos sólidos y líquidos según su naturaleza y nivel de peligrosidad, así como de su tratamiento y eliminación (ya sea por cuenta propia o a través de terceros) de acuerdo con la normativa vigente.
8. Los operadores deben ser capaces de distinguir los colores aguamarina, naranja y verde.
9. El incumplimiento del protocolo descrito, así como de las especificaciones relativas al equipo y los reactivos, puede afectar al rendimiento y dar lugar a resultados falsos positivos o negativos.
10. La sonda no se debe diluir ni mezclar con otras sondas.
11. Si no se usan 10 µl de sonda durante la fase del protocolo previa a la desnaturalización, el resultado se podría ver afectado y se podrían generar falsos positivos o falsos negativos.
12. Todos los productos deben validarse antes de su uso.
13. Los controles internos se deben llevar a cabo usando poblaciones celulares intactas en las muestras de la prueba.
14. Deben tomarse precauciones para evitar la contaminación entre los viales que contienen LPA002 y LPA003.

Definiciones de temperatura

- -20 °C / Congelado / En el congelador: -25 °C a -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Temperatura ambiente (TA): +15 °C a +25 °C

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 FISH, la tinción DAPI Antifade ES y la solución de hibridación permanecen estables a lo largo de los ciclos de congelación-descongelación experimentados durante el uso normal (donde un ciclo constituye la retirada del vial y su reintroducción en el congelador). **Sondas FISH:** 5 ciclos para el kit de 5 pruebas, 10 ciclos para el kit de 10 pruebas, 30 ciclos para el kit de 30 pruebas, 50 ciclos para el kit de 50 pruebas. **Tinción de contraste:** 10 ciclos para el kit de 5 pruebas, 20 ciclos para el kit de 10 pruebas, 60 ciclos para el kit de 30 pruebas y 100 ciclos para el kit de 50 pruebas. La exposición a la luz debe reducirse al mínimo y evitarse siempre que sea posible. Guarde los componentes en el recipiente a prueba de luz suministrado. Los componentes utilizados y almacenados en condiciones distintas a las indicadas en el etiquetado pueden no funcionar como se espera y afectar negativamente a los resultados del ensayo. Hay que hacer todo lo posible por limitar la exposición a la luz.

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 precisión 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. Centrífuga 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. 1 M 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 este kit de sondas se excitarán y emitirán en las siguientes longitudes de onda:

Fluoróforo	Excitación _{máx} [nm]	Emisión _{máx} [nm]
Cian	418	467
Verde	495	521
Naranja	551	572

Asegúrese de colocar en el microscopio los filtros de excitación y emisión adecuados para cubrir las longitudes de onda mencionadas más arriba.

El filtro de paso de banda triple DAPI/FITC/TRITC es ideal para observar simultáneamente los fluorocromos verdes y naranjas, así como la tinción de contraste. El fluoróforo Aqua es específico para el espectro Aqua y DEAC (se requiere un filtro de paso de banda único para Aqua o DEAC).

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 oscurecería las señales. Se deberán seguir las recomendaciones de los fabricantes relativas a la vida útil de la bombilla y la antigüedad de los filtros.

Preparación de las muestras

El kit está diseñado para su uso en células fijadas con la solución de Carnoy (metanol y ácido acético en proporción 3:1), obtenidas de muestras de líquido amniótico, con el fin de realizar el recuento de los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21 en embarazos de alto riesgo en los que se sospeche la presencia de síndrome de Turner, Patau, Edwards o de Down, y que se hayan preparado de acuerdo con las directrices del laboratorio o de la institución. La recogida de muestras de líquido amniótico debe realizarse de acuerdo con las directrices del laboratorio o de la institución. No deben utilizarse muestras que parezcan sanguinolentas o marrones, ya que pueden contener sangre materna y dar lugar a resultados falsos. Se han de preparar muestras secadas al aire en portaobjetos para microscopio de acuerdo con los procedimientos citogenéticos habituales. El *Manual de laboratorio de citogenética* de AGT contiene recomendaciones para la recogida de muestras, el cultivo, la obtención de células y la preparación de portaobjetos.¹²

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 6 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 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: 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. Deshidrátele 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 microcentrífuga. 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 súmelo 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).

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 Cytocell 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.
- 4. 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.
- 5. Una desnaturalización incompleta puede ocasionar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede redundar en una unión no específica.
- 6. La hibridación excesiva puede dar lugar a señales adicionales o inesperadas.
- 7. Los usuarios deberán optimizar el protocolo de sus muestras antes de utilizar el ensayo con fines diagnósticos.
- 8. 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

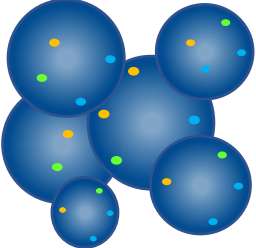
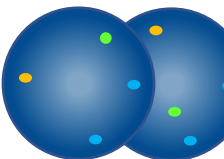
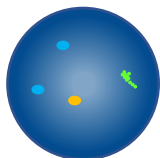
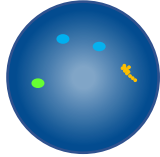
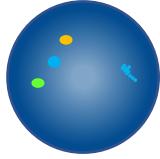
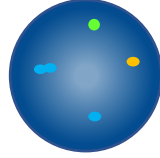
El portaobjetos no se deberá analizar si se dan las siguientes condiciones:

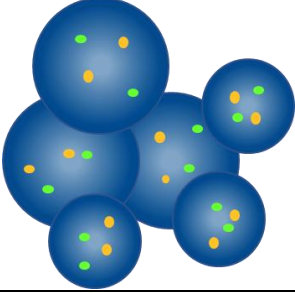
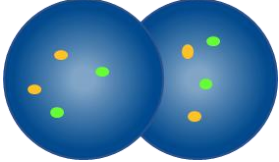
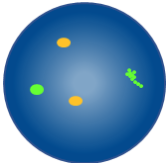
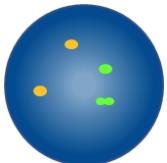
- Las señales son demasiado débiles para analizarse con un solo filtro: para proceder a realizar el análisis, las señales deberán mostrarse intensas, distinguirse y evaluarse con facilidad.
- Hay una gran cantidad de células aglomeradas o superpuestas que dificultan el análisis.
- Más del 50 % de las 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 debe puntuar de forma independiente suficientes núcleos de cada muestra para que las puntuaciones combinadas de los analistas cumplan los criterios mínimos especificados por las directrices institucionales, regionales o nacionales. El primer analista debe comenzar el análisis por la parte izquierda de la diapositiva y el segundo analista, por la derecha.
- 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 plantee dudas.

Directrices de análisis - LPA002	
	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 una señal verde, una señal naranja y dos señales turquesas; la señal verde es difusa
	Se contabilizan como una señal verde, una señal naranja y dos señales turquesas; la señal naranja es difusa.
	Se contabilizan como una señal verde, una señal naranja y dos señales turquesas; una de las dos señales turquesas es difusa
	Se contabilizan como una señal verde, una señal naranja y dos señales turquesas: el espacio en la señal turquesa es inferior a dos anchos de sonda

Directrices de análisis - LPA003	
	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 naranjas y dos verdes; una de las dos señales verdes es difusa
	Se contabilizan como dos semáforos naranjas y dos verdes: el intervalo entre un semáforo verde es inferior a dos anchuras de semáforo

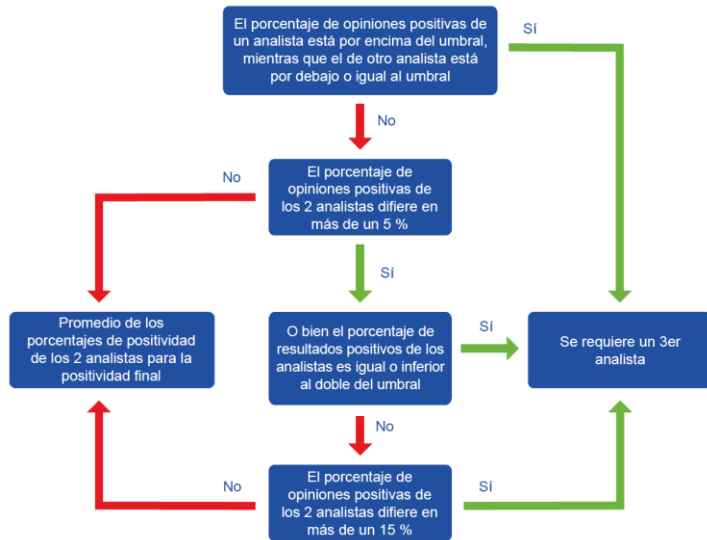
Requisitos del tercer analista

Dependiendo del número de núcleos anormales que haya observado cada analista, podría ser necesario recurrir a un tercer analista. El tercer analista analizará el mismo número de núcleos que los dos primeros analistas, según especifiquen las directrices institucionales, regionales o nacionales. Las normas relativas a un tercer analista se detallan en el texto y el diagrama de flujo que figuran a continuación.

La intervención de un tercer analista resulta necesaria en los siguientes casos:

- El porcentaje de positividad de uno de los analistas está por encima del umbral y el de los demás por debajo o en el umbral.
- El porcentaje de resultados positivos de los dos analistas difiere en más de un 5 %, y el porcentaje de resultados positivos de cualquiera de los dos analistas es igual o inferior al doble del valor de corte.
- El porcentaje de opiniones positivas de ambos analistas difiere en más de un 15 %.

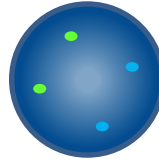
De las tres puntuaciones obtenidas, se promediarán los dos valores porcentuales positivos más próximos para obtener la positividad final. Si las 3 puntuaciones están equidistantes, se debe utilizar el valor mediano de positividad.



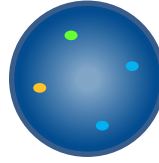
Resultados previstos

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Patrones previstos de señales normales

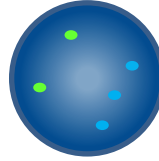


En una célula femenina normal, se esperan dos señales verdes y dos azul (2V2C).

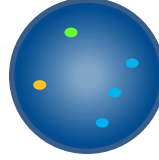


En una célula macho normal, se esperan una señal verde, una naranja y dos azul (1V1N2C).

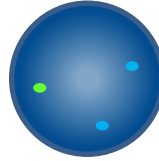
Patrones previstos de señales anómalas



En una célula femenina con trisomía 18, el patrón de señal esperado será de dos señales verdes y tres señales azul (2V3C).



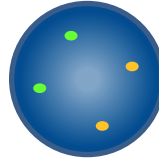
En una célula masculina con trisomía 18, el patrón de señal esperado será una señal verde, una señal naranja y tres señales azul (1V1N3C)



En una célula con síndrome de Turners, el patrón de señal esperado será una señal verde y dos señales azul (1V2C).

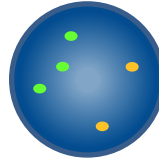
LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Patrón previsto de señales normales

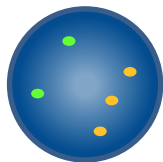


En una célula normal, se esperan dos señales verdes y dos naranjas (2V2N).

Patrones previstos de señales anómalas



En una célula con trisomía 13, se esperarán tres señales verdes y dos señales naranjas (3V2N).



En una célula con trisomía 21, se esperarán dos señales verdes y tres señales naranjas (2V3N).

Es posible observar otros patrones de señales en muestras aneuploides o no equilibradas.

Interferencias relevantes conocidas / Sustancias interferentes

No se conocen interferencias / sustancias interferentes relevantes.

Reactividad cruzada conocida

La sonda DXZ1 puede presentar hibridación cruzada con los centrómeros de los cromosomas 1, 11, 17 y Y.

La sonda DY23 puede presentar hibridación cruzada con los centrómeros de los cromosomas 13, 14, 15, 20, 21, 22 y X.

La sonda D18Z1 puede mostrar hibridación cruzada con los centrómeros de los cromosomas 2, 4, 8, 9, 13, 14, 15, 20, 21 y 22.

Notificación de incidentes graves

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con idéntico régimen normativo (Reglamento (UE) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*); si, durante el uso de este producto o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, notifíquelo al Fabricante y a su Autoridad Nacional Competente.

En caso de incidentes graves en otros países, notifíquelo al fabricante y, si procede, a su autoridad nacional competente.

Contacto de vigilancia del fabricante: vigilance@ogt.com

Las autoridades nacionales competentes de la UE pueden consultar una lista de puntos de contacto de vigilancia en:

https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Características específicas sobre el rendimiento

Especificidad analítica

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

La especificidad analítica se define como el porcentaje de señales que hibridan con el locus correcto y no con otros puntos. Se analizaron 4 loci cromosómicos en cada una de las 20 células en metafase de 5 muestras, lo que arroja 100 puntos de datos cada uno para los cromosomas X e Y y 200 puntos de datos para el cromosoma 18. 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. Este resultado se expresó en porcentaje con un intervalo de confianza del 95 %.

Tabla 1. Especificidad analítica de LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Locus de interés	Número de metafases cromosómicas hibridadas	Número de loci correctamente hibridados	Especificidad analítica	Intervalo de confianza del 95 %
Xp11.1-q11.1	100	100	100 %	96,30 - 100 %
Yp11.1-q11.1	100	100	100 %	96,30 - 100 %
18p11.1-q11.1	200	200	100 %	98,12 % - 100 %

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

La especificidad analítica se define como el porcentaje de señales que hibridan con el locus correcto y no con otros puntos. Se analizaron 4 loci cromosómicos en cada una de las 20 células en metafase de las 5 muestras, lo que proporcionó 200 puntos de datos para cada uno de los cromosomas 13 y 21. 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. Este resultado se expresó en porcentaje con un intervalo de confianza del 95 %.

Tabla 2. Especificidad analítica de LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Locus de interés	Número de metafases cromosómicas hibridadas	Número de loci correctamente hibridados	Especificidad analítica	Intervalo de confianza del 95 %
13q14.2	200	200	100 %	98,12 % - 100 %
21q22.1	200	200	100 %	98,12 % - 100 %

Sensibilidad analítica

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

La sensibilidad analítica es el porcentaje de células en interfase puntuables que presentan el patrón previsto de señales normales. Se analizó un mínimo de 50 células interfásicas de cada una de las 25 suspensiones celulares fijadas procedentes de muestras de líquido amniótico de varones cariotípicamente normales y de 25 mujeres cariotípicamente normales consideradas con un complemento normal del cromosoma 18, lo que dio como resultado un mínimo de 2.500 núcleos puntuados en total. 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 3. Sensibilidad analítica de LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Tipo de muestra	Criterios de sensibilidad	Resultado de la sensibilidad
Líquido amniótico	>95 %	95,99 % (95,15-96,69 %)

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

La sensibilidad analítica es el porcentaje de células en interfase puntuables que presentan el patrón previsto de señales normales. Se analizó un mínimo de 50 células interfásicas por cada una de las 25 suspensiones celulares fijadas procedentes de muestras de líquido amniótico de varones o mujeres cariotípicamente normales, considerados con un complemento normal de cromosomas 13 y 21, lo que dio como resultado un mínimo de 1250 núcleos puntuados 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 4. Sensibilidad analítica de LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Tipo de muestra	Criterios de sensibilidad	Resultado de la sensibilidad
Líquido amniótico	>95 %	96,24 % (94,84-97,64 %)

Caracterización de los valores de corte normales

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

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 analizó un mínimo de 50 células interfásicas de cada una de las 25 suspensiones celulares fijadas procedentes de muestras de líquido amniótico de varones cariotípicamente normales y de 25 mujeres cariotípicamente normales consideradas con un complemento normal del cromosoma 18, lo que dio como resultado un mínimo de 2.500 núcleos puntuados en total.

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 5. Caracterización de los valores de corte normales para LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Tipo de muestra	Patrón de señales	Resultado del corte
Líquido amniótico	1V1N3C	11,62 %
	2V3C	8,97 %
	1V2C	13,98 %

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

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 analizó un mínimo de 50 células en interfase para cada una de las suspensiones celulares de líquido amniótico de 25 varones o mujeres cariotípicamente normales, lo que dio como resultado un mínimo de 1250 núcleos puntuados para 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 6. Caracterización de los valores de corte normales para LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Tipo de muestra	Patrón de señales	Resultado del corte
Líquido amniótico	2V3N	8,97 %
	3V2N	

Los laboratorios deberán verificar los valores de corte usando sus propios datos.^{13,14}

Precisión
LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe
La precisión de este producto se ha medido como la precisión intradiaria (entre distintas muestras), la precisión interdiaria (entre distintos días) y la precisión entre lotes en un único centro (entre distintos lotes).

Se utilizaron 3 muestras para evaluar la precisión de este producto: 1 muestra de líquido amniótico masculino normal considerada XY y con una dotación normal del cromosoma 18, 1 muestra de líquido amniótico femenino normal considerada XX y con una dotación normal del cromosoma 18, y 1 muestra de líquido amniótico femenino con trisomía 18 de baja positividad.

La precisión interdiaria e intradiaria se evaluó analizando las muestras por triplicado a lo largo de 10 días no consecutivos. La precisión lote a lote se evaluó probando 3 lotes independientes del producto por triplicado utilizando las mismas muestras. Los resultados se expresaron como concordancia global con la clasificación esperada (positiva o negativa).

Tabla 7. Reproducibilidad y precisión de LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Variable	Tipo de muestra	Concordancia
Dentro del día	Líquido amniótico femenino negativo	100,0 %
	Líquido amniótico femenino de trisomía 18	90,0 %
Entre días	Líquido amniótico femenino negativo	100,0 %
	Líquido amniótico femenino de trisomía 18	90,0 %
	Líquido amniótico masculino negativo	100,0 %
Entre lotes	Líquido amniótico femenino negativo	100,0 %
	Líquido amniótico femenino de trisomía 18	100,0 %
	Líquido amniótico masculino negativo	100,0 %

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe
La precisión de este producto se ha medido como la precisión intradiaria (entre distintas muestras), la precisión interdiaria (entre distintos días) y la precisión entre lotes en un único centro (entre distintos lotes).

Se utilizaron 3 muestras para evaluar la precisión de este producto: 1 muestra de líquido amniótico normal considerada con un complemento normal de cromosomas 13 y 21, 1 muestra de líquido amniótico con trisomía 13 baja positiva y 1 muestra de líquido amniótico con trisomía 21 baja positiva.

La precisión interdiaria e intradiaria se evaluó analizando las muestras por triplicado a lo largo de 10 días no consecutivos. La precisión lote a lote se evaluó probando 3 lotes independientes del producto por triplicado utilizando las mismas muestras. Los resultados se expresaron como concordancia global con la clasificación esperada (positiva o negativa).

Tabla 8. Reproducibilidad y precisión de LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Variable	Tipo de muestra	Concordancia
Dentro del día y entre días	Líquido amniótico negativo	100,0 %
	Líquido amniótico con trisomía 13 poco positivo	100,0 %
	Líquido amniótico con trisomía 21 poco positivo	96,7 %
Entre lotes	Líquido amniótico negativo	88,9 %
	Líquido amniótico con trisomía 13 poco positivo	100,0 %
	Líquido amniótico con trisomía 21 poco positivo	100,0 %

Rendimiento clínico
LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe
Para garantizar que la sonda prenatal de enumeración X, Y y 18 detecta los reordenamientos previstos, se estableció el rendimiento clínico a lo largo de un estudio sobre muestras representativas de la población prevista para el producto: Material residual fijado con metanol/ácido acético 3:1 procedente de muestras de líquido amniótico prenatal. El tamaño de la muestra para el estudio fue de 71 especímenes, con una población de 3 especímenes positivos para la trisomía 18, 2 especímenes positivos para la monosomía X y 66 especímenes negativos. 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 9. Rendimiento clínico de Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Variable	Resultado
Sensibilidad clínica (tasa de verdaderos positivos, TVP)	100,0 %
Especificidad clínica (tasa de verdaderos negativos, TVN)	100,0 %
Tasa de falsos positivos (TFP) = 1 - especificidad	0,0 %

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe
Para garantizar que la sonda prenatal de enumeración 13 y 21 detecta los reordenamientos previstos, se estableció el rendimiento clínico a lo largo de tres estudios en muestras representativas de la población prevista para el producto: Material residual fijado con metanol/ácido acético 3:1 procedente de muestras de líquido amniótico prenatal. El tamaño de la muestra para el estudio fue de 172 especímenes, con una población de 15 especímenes con trisomía 13 positiva y 157 con trisomía 13 negativa, y un total de 109 especímenes con trisomía 21 positiva y 63 con trisomía 21 negativa. 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 10. Rendimiento clínico de Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Variable	Resultado
Sensibilidad clínica (tasa de verdaderos positivos, TVP)	100,0 %
Especificidad clínica (tasa de verdaderos negativos, TVN)	100,0 %
Tasa de falsos positivos (TFP) = 1 - especificidad	0,0 %

Resumen de seguridad y rendimiento (SSP)
La PSS se pondrá a disposición del público a través de la base de datos europea sobre productos sanitarios (Eudamed), donde estará vinculada a la UDI-DI básica.
URL de Eudamed: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>
UDI-DI básico: 50558449LPA001GG

Si Eudamed no funciona plenamente, la plataforma compartida única se pondrá a disposición del público previa solicitud por correo electrónico a la dirección siguiente SSP@oqt.com.

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@cytocell.com
Sitio web: www.oqt.com

Bibliografía
1. Alliance G, (2010). Chromosomal Abnormalities [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK132134/>.
2. Dey M, et al., (2013). Prenatal screening methods for aneuploidies. North American Journal of Medical Sciences.
3. Antonarakis SE, Strydom A., (2020). Down Syndrome. Nature Reviews Disease Primers.
4. Orphanet: Down syndrome [Internet]. www.orpha.net. Available from: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/870>.
5. Orphanet: Trisomy 13 [Internet]. www.orpha.net. Available from: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/3378>.
6. Pyle AK, et al. (2025) Guidance for Caring for Infants and Children With Trisomy 13 and Trisomy 18: Clinical Report. PEDIATRICS.
7. Balasundaram P, et al. (2023). Edwards syndrome. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Updated 2025 Feb 15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570597/>.
8. Shankar Kikkeri N, et al., (2023). Turner Syndrome; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554621/>.
9. Best Practice Guidelines (2024). The Association for Clinical Genomic Science (ACGS). Cytogenetics Constitutional Guidelines.
10. NHS England - National genomic test directory for rare and inherited disease. Available from: <https://www.england.nhs.uk/publication/national-genomic-test-directories/>
11. Silva M. et al. (2019) European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. European Journal of Human Genetics.
12. Asham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc. References
13. 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.
14. 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.

EN ISO 15223-1:2021 - «Productos sanitarios - Símbolos a utilizar con la información a suministrar por el fabricante		
Parte 1: Requisitos generales»		
(© International Organization for Standardization)		
Símbolo	Título	Referencia(s)
	es: Fabricante	5.1.1.
	es: Representante autorizado en la Comunidad Europea/ Unión Europea	5.1.2
	es: Fecha de caducidad	5.1.4.
	es: Código de lote	5.1.5.
	es: Número de catálogo	5.1.6.
	es: Manténgase alejado de la luz solar	5.3.2.
	es: Límite de temperatura	5.3.7.
	es: Consulte las instrucciones de uso	5.4.3.
 oqt.com/IFU	es: Consulte las instrucciones de uso electrónicas	5.4.3.
	es: Precaución	5.4.4.
	es: Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>	5.5.1.
	es: Contiene suficiente para <n> ensayos	5.5.5
	es: Identificador único de dispositivo	5.7.10
Símbolos de la EDMA para reactivos y componentes de IVD, revisión de octubre de 2009		
Símbolo	Título	Referencia(s)
	es: Contenido (o contiene)	N/A

Patentes y marcas comerciales
CytoCell es una marca registrada de CytoCell Limited.



CytoCell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4, 0PZ
REINO UNIDO

Teléfono: +44 (0)1223 294048
Correo electrónico: probes@cytoCell.com
Sitio web: www.oqt.com



Sysmex Europe SE
Deelböge 19 D
22297 Hamburgo
ALEMANIA

Sitio web: www.sysmex-europe.com

Historial de versiones de IFU
V001 2026-03-09: Nueva IFU para el Reglamento (UE) 2017/746