



A Sismex Group Company



Instrucciones de uso

REF: LPH 067-S / LPH 067 / LPH 067-20

CLL PROFILER Kit



SOLO PARA USO PROFESIONAL



www.cytocell.com

Más información y otros idiomas disponibles en www.cytocell.com

Limitaciones

Este producto está diseñado para detectar pérdidas genómicas mayores que la región cubierta por los clones rojo y verde de este conjunto de sondas, en la que se incluyen las regiones P53 (TP53), ATM y D13S319, o detectar ganancias mayores que la región cubierta por el clon azul de este conjunto de sondas, en la que se incluye el centrómero del cromosoma 12. Es posible que con este producto no se detecten ganancias o pérdidas genómicas fuera de estas regiones ni ganancias o pérdidas parciales de las mismas.

El ensayo no está previsto para su uso como técnica diagnóstica, prueba prenatal, método de cribado poblacional, análisis de diagnóstico inmediato o prueba de autodiagnóstico independiente. Este producto está previsto exclusivamente a un uso clínico profesional y todos los resultados deben ser interpretados por personal debidamente cualificado teniendo en cuenta los resultados de otros ensayos pertinentes.

Este producto no ha sido validado para su uso en tipos de muestras o de enfermedades distintas de las especificadas en su uso previsto.

La notificación y la interpretación de los resultados de ensayos de hibridación *in situ* fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés) deben llevarse a cabo de conformidad con las normas de práctica profesional y tener en cuenta otros datos clínicos y de diagnóstico. Este kit está previsto como complemento de otras pruebas analíticas diagnósticas, por lo que no se debe iniciar ninguna acción terapéutica basada exclusivamente en el resultado de un ensayo de FISH.

Si no se sigue el protocolo, el resultado se podría ver afectado y se podrían generar falsos positivos o falsos negativos.

Este kit no ha sido validado para ningún fin que no esté cubierto en el uso previsto declarado.

Uso previsto

El Cytocell® Aquarius CLL PROFILER Kit es un ensayo cualitativo no automatizado de hibridación *in situ* fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés) que permite detectar deleciones cromosómicas en la región 11q22.3 del cromosoma 11, la región 17p13.1 del cromosoma 17 o las regiones 13q14.2 y 13q14.3 del cromosoma 13, o ganancias de la región centromérica del cromosoma 12 en suspensiones de células de origen hematológico fijadas en solución fijadora de Carnoy (3:1 metanol/ácido acético) de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC).

Indicaciones

Este producto está previsto como complemento de otras pruebas clínicas e histopatológicas en protocolos diagnósticos clínicos reconocidos en los que resultaría relevante para el tratamiento clínico el conocimiento del estado de deleción de los genes P53 (TP53), ATM o D13S319 o de ganancia del centrómero del cromosoma 12.

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 los análisis citogenéticos por bandeado cromosómico de Giemsa, se emplean sondas de ADN que hibridan con cromosomas completos o secuencias únicas simples. Esta técnica ahora puede aplicarse como una herramienta de investigación esencial en el análisis cromosómico prenatal de tumores sólidos y hematológicos. 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 contrañe 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 Cytocell CLL PROFILER Kit está diseñado para detectar las deleciones de los genes TP53, ATM y D13S319, y las ganancias de las secuencias centroméricas del cromosoma 12 en muestras de sangre periférica o médula ósea de pacientes con LLC.

P53(TP53)/ATM Probe Combination

El gen TP53 (*proteína tumoral p53*), ubicado en 17p13.1, es uno de los genes supresores tumorales más importantes; actúa como potente factor de transcripción y desarrolla un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genética. La ausencia del gen TP53, considerada el marcador del peor pronóstico de la LCC, se ha registrado en el 10 % de los pacientes con esta enfermedad^{1,2}.

El gen ATM (*serina/treonina cinasa ATM*), que se encuentra en 11q22.3, es un gen de punto de control importante que interviene en la respuesta al daño celular y sus funciones son evaluar el nivel de daño que presenta el ADN de la célula e intentar su reparación mediante la fosforilación de sustratos clave involucrados en la vía de respuesta al daño del ADN³. La ausencia del gen TP53, considerada un marcador de mal pronóstico de la LCC, se ha registrado en el 18 % de los pacientes con esta enfermedad⁴.

El análisis de la interacción ATM-TP53 en la LLC ha puesto de manifiesto el importante papel que desempeñan los genes TP53 y ATM en la proliferación de los tumores linfáticos⁵. Se ha demostrado que el gen ATM aumenta la fosforilación del gen TP53 cuando el daño es tal que la célula debe destruirse por apoptosis (mediada por el gen TP53). La deleción del gen ATM suprime esta actividad de punto de control y, por ende, la activación del gen TP53. Por tanto, no se produce ningún intento de reparación, o de apoptosis, de las células dañadas a pesar de la presencia del gen TP53. Ante la ausencia del gen ATM, las células dañadas pueden seguir proliferando⁵.

D13S319/13qter/12cen Deletion/Enumeration

Además, las deleciones que afectan a 13q14 representan las anomalías estructurales más frecuentes en la LLC^{6,7,8}. Se ha observado que entre el 30 % y el 60 % de los pacientes con LLC presenta deleción heterocigota en esta región y que entre el 10 % y el 20 % muestra deleción homocigota⁹. Asimismo, se ha demostrado que la tasa de supervivencia es similar en los dos grupos¹⁰. En ausencia de otras lesiones genéticas, los pacientes con deleciones de 13q14 se clasifican como de riesgo muy bajo¹.

Dos genes de ARN no codificante, DLEU1 (*suprimido en la leucemia linfocítica 1*) y DLEU2 (*suprimido en la leucemia linfocítica 2*), más el marcador genético D13S319 delimitan la región patógena crítica 13q14¹¹. El gen DLEU1 está considerado el gen supresor tumoral candidato asociado a la LLC más probable de la región 13q14¹². La trisomía 12, identificada en el 20 % de los casos¹³, es una anomalía recurrente en la LLC y con frecuencia se presenta como la única aberración citogenética (40-60 % de los casos con trisomía 12)⁷. En ausencia de otras lesiones genéticas, los pacientes con trisomía 12 se clasifican como de riesgo bajo¹.

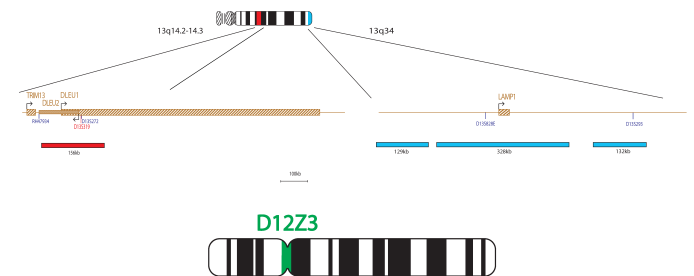
Características de las sondas

D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

D13S319, 13q14.2, en rojo

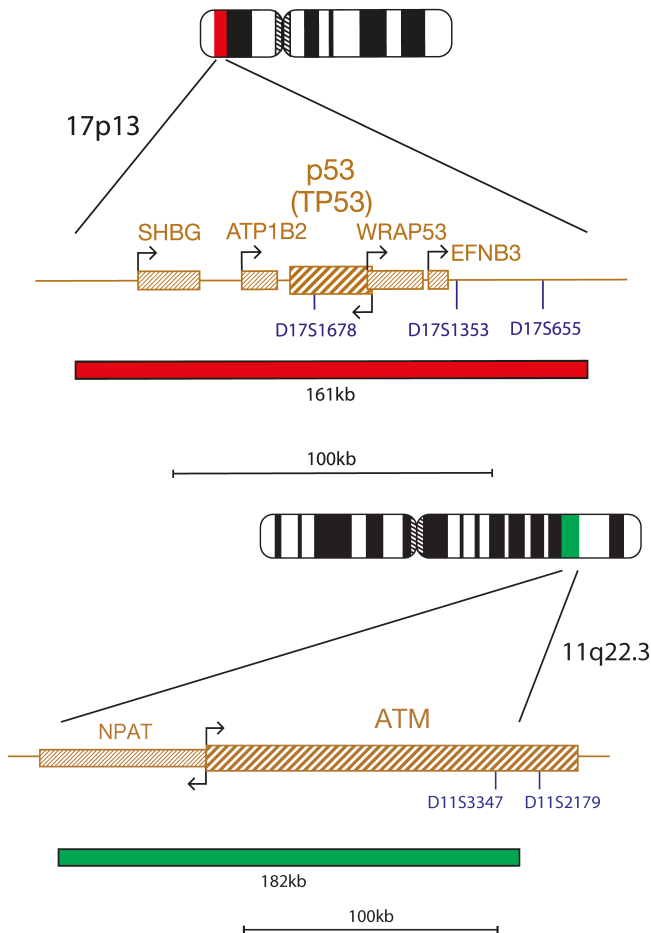
13qter, 13q34, en azul

D12Z3, 12p11.1-q11.1, en verde



Chromosome 12 Alpha Satellite Probe es una sonda de secuencia de repetición, marcada en verde, que reconoce la secuencia de repetición centromérica D12Z3. La sonda D13S319, marcada en rojo, cubre una región de 156 kb que abarca todo el gen DLEU1 y la mayor parte del gen DLEU2, así como los marcadores D13S319, D13S272 y RH47934. La sonda específica subtelomérica 13qter, marcada en azul, permite la identificación del cromosoma 13 y actúa como sonda de control.

P53 (TP53)/ATM
 P53, 17p13.1, en rojo
 ATM, 11q22.3, en verde



El componente P53 se compone de una sonda de 161 kb, marcada en rojo, que cubre todo el gen P53 (TP53) y las regiones flanqueantes. El componente ATM se compone de una sonda de 182 kb, marcada en verde, que cubre el extremo telomérico del gen NPAT y el extremo centromérico del gen ATM rebasando el marcador D11S3347.

Materiales suministrados

D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe:

50 µl por vial (5 ensayos), 100 µl por vial (10 ensayos) o 200 µl por vial (20 ensayos)

P53 (TP53) /ATM Probe:

50 µl por vial (5 ensayos), 100 µl por vial (10 ensayos) o 200 µl por vial (20 ensayos)

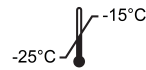
Las sondas se suministran premezcladas en disolución de hibridación (formamida; sulfato de dextrano; citrato de sodio salino [SSC]) y vienen listas para su uso.

Tinción de contraste: 150 µl por vial (15 ensayos) o 500 µl por vial (50 ensayos)
 Se utiliza DAPI AntiFade como tinción de contraste (ES: 0,125 µg/ml de DAPI [4,6-diamidino-2-fenilindol]).

Advertencias y precauciones

1. Para uso diagnóstico *in vitro*. Solo para uso profesional.
2. Use guantes al manipular las sondas de ADN y la tinción de contraste con DAPI.
3. Las mezclas de las sondas contienen formamida, que es un teratógeno; no respire los vapores ni permita que entre en contacto con la piel. Manipúlelo con cuidado; utilice guantes y bata de laboratorio.
4. El DAPI puede ser carcinógeno. Manipúlelo con cuidado; utilice guantes y bata de laboratorio.
5. Deseche todos los materiales peligrosos de acuerdo con las directrices de eliminación de residuos peligrosos de su centro.
6. Todos los operarios deberán poder distinguir los colores rojo, azul y verde.
7. Si no se siguen el protocolo y los reactivos indicados, el resultado se podría ver afectado y se podrían producir falsos positivos o falsos negativos.
8. La sonda no se deberá diluir ni mezclar con otras sondas.
9. 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.

Conservación y manipulación



El kit Aquarius® debe 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 deben 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. Debe 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 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 termostable
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]
Cian	418	467
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. Es necesario usar un filtro de paso monobanda de espectro cian para una visualización óptima del espectro cian o un filtro de paso de banda triple espectro rojo/espectro verde/espectro cian para la visualización simultánea de los fluoróforos verdes, rojos y cian.

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. Debe evitarse la mezcla de DAPI AntiFade con aceite de inmersión para microscopio, puesto que esto oscurecerá las señales. Se deben 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 sangre periférica o de médula ósea 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 portaobjetos¹⁴.

Preparación de las soluciones

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 solución 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 solución hasta cuatro semanas a temperatura ambiente en un recipiente hermético.

Solución de 0,4xSSC

Diluya 1 parte de solución 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 solución hasta cuatro semanas a temperatura ambiente en un recipiente hermético.

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

Diluya 1 parte de solución 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 solución hasta cuatro 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. **(Alternativamente si se usa una cámara de secado citogenético:** se deberán depositar las muestras en los portaobjetos usando 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, use 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 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 sumérjalo 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 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

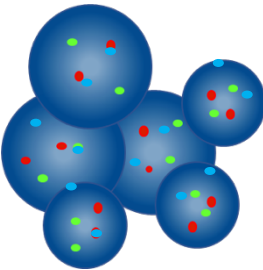
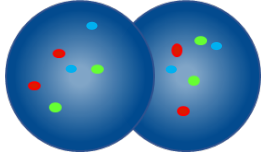
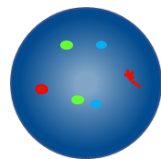
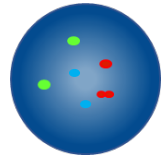
Evaluación de la calidad del portaobjetos

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 debe 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

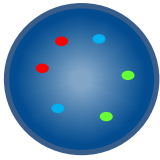
- Cada muestra debe ser analizada e interpretada por dos analistas. Cualquier discrepancia debe resolverse mediante la valoración de un tercer analista.
- Cada analista deberá estar debidamente cualificado según los criterios nacionales reconocidos.
- Cada analista deberá puntuar de manera independiente 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 plantee 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, dos señales azules y dos señales verdes: una de las dos señales rojas es difusa.
	Se contabilizan como dos señales rojas, dos señales azules y dos señales verdes: la separación en una de las señales rojas es inferior al ancho de dos señales.

Resultados previstos

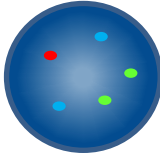
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

Patrón previsto de señales normales

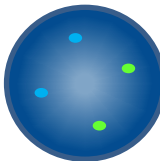


En una célula normal, se espera observar dos señales rojas, dos señales azules y dos señales verdes (2 R, 2 A, 2 V).

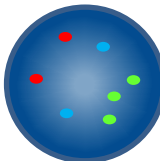
Patrones previstos de señales anómalas



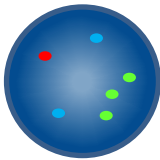
En una célula con delección hemicigota del locus D13S319, el patrón de señal previsto será de una señal roja, dos señales azules y dos señales verdes (1 R, 2 A, 2 V).



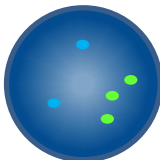
En una célula con delección homocigota del locus D13S319, el patrón de señal previsto será de cero señales rojas, dos señales azules y dos señales verdes (0 R, 2 A, 2 V).



En una célula con trisomía 12 y un estado normal del locus D13S319, el patrón de señal previsto será de dos señales rojas, dos señales azules y tres señales verdes (2 R, 2 A, 3 V).



En una célula con trisomía 12 y delección hemicigota del locus D13S319, el patrón de señal previsto será de una señal roja, dos señales azules y tres señales verdes (1 R, 2 A, 3 V).

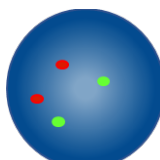


En una célula con trisomía 12 y delección homocigota del locus D13S319, el patrón de señal previsto será de cero señales rojas, dos señales azules y tres señales verdes (0 R, 2 A, 3 V).

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

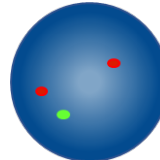
P53/ATM Probe

Patrón previsto de señales normales

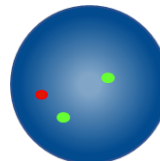


En una célula normal, se espera observar dos señales rojas y dos señales verdes (2 R, 2 V).

Patrones previstos de señales anómalas



En una célula con delección del gen ATM, el patrón de señal previsto será de dos señales rojas y una señal verde (2 R, 1 V).



En una célula con delección del gen P53, el patrón de señal previsto será de una señal roja y dos señales verdes (1 R, 2 V).

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

Reactividad cruzada conocida

Es posible que la sonda D12Z3 verde muestre hibridación cruzada en los cromosomas 3, 6, 7 y 10.

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 debe 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 es el porcentaje de señales que hibridan con el locus correcto y no con otros puntos. La especificidad analítica se estableció mediante el análisis de un total de 200 locus de interés. La especificidad analítica se calculó como el número de señales de FISH que hibridan con el locus correcto dividido por el número total de señales de FISH hibridadas.

Tabla 1. Especificidad analítica del CLL PROFILER Kit

Kit	Sonda	Locus de interés	N.º de señales hibridadas con el locus correcto	N.º total de señales hibridadas	Especificidad (%)
D13S319/ 13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	D13S319 roja	13q14.2	200	200	100
	13qter azul	13q34	200	200	100
	D12Z3 verde	12p11.1- q11.1	200	200	100
P53/ATM Probe	Roja P53	17p13	200	200	100
	ATM verde	11q22.3	200	200	100

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica es el porcentaje de células en interfase puntuables que presentan el patrón previsto de señales normales. La sensibilidad analítica se estableció mediante el análisis de células en interfase de distintas muestras normales. La sensibilidad se calculó como el porcentaje de células puntuables que presentan el patrón previsto de señales normales (con un intervalo de confianza del 95 %).

Tabla 2. Sensibilidad analítica de CLL PROFILER Kit

Kit	N.º de células con patrones de señales previstos	N.º de células con señales puntuables	Sensibilidad (%)	Intervalo de confianza del 95 %
D13S319/ 13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	467	500	93,4	2,6
P53/ATM Probe	479	500	95,8	1,7

Caracterización de los valores de corte normales

El valor de corte normal, con respecto a las sondas de FISH, es el porcentaje máximo de células en interfase puntuables que presentan un patrón de señales anómalas específico en el que una muestra se considera normal para ese patrón de señales.

El valor de corte normal se estableció utilizando muestras de pacientes normales y positivos. En cada muestra, se registraron los patrones de señales de 100 células. Se calculó el índice de Youden para hallar el valor umbral en el que se maximiza la sensibilidad + la especificidad-1.

Tabla 3. Caracterización de los valores de corte normales de CLL PROFILER Kit

Kit	Reordenamiento	Patrón de señales anómalas	Índice de Youden	Corte normal (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	Deleción hemigota de D13S319	1 R, 2 A, 2 V	0,96	6
	Trisomía 12	2 R, 2 A, 3 V	0,99	4
P53/ATM Probe	Deleción de P53	1 R, 2 V	0,99	8
	Deleción de ATM	2 R, 1 V	0,99	8

Los laboratorios deberán verificar los valores de corte usando sus propios datos^{15,16}.

Precisión y reproducibilidad

La precisión es la medición de la variación natural de un ensayo cuando se repite varias veces en condiciones idénticas. En este caso, se evaluó analizando las repeticiones de las sondas de un mismo número de lote probadas con la misma muestra, el mismo día y en las mismas condiciones.

La reproducibilidad es la medición de la variabilidad de un ensayo y se ha establecido como la variabilidad entre distintas muestras, distintos días y distintos lotes. La reproducibilidad entre distintos días se evaluó analizando las mismas muestras en tres fechas distintas. La reproducibilidad entre distintos lotes se evaluó analizando las mismas muestras en una misma fecha con sondas procedentes de tres números de lote distintos. La reproducibilidad entre distintas muestras se evaluó analizando tres copias de una muestra en una misma fecha. De cada muestra se registraron los patrones de señales de 100 células en interfase y se calculó el porcentaje de células con el patrón de señales previsto.

Asimismo, se calcularon la reproducibilidad y la precisión como la desviación estándar entre las reproducciones de cada variable, así como la desviación estándar media global.

Tabla 4. Reproducibilidad y precisión de CLL PROFILER Kit

Variable	Desviación estándar (DE)	
	D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	P53/ATM Probe
Precisión	1,28	1,37
Entre distintas muestras	1,30	1,60
Entre distintos días	4,12	2,27
Entre distintos lotes	2,04	1,77
Desviación global	3,30	1,98

Rendimiento clínico

El rendimiento clínico se estableció a partir de una muestra representativa de la población a la que va destinada el producto. En cada muestra, se registraron los patrones de señales de más de 100 células en interfase. Se estableció una determinación normal o anómala comparando el porcentaje de células con el patrón de señales anómalas específico con el valor de corte normal. A continuación, los resultados se compararon con el estado conocido de la muestra.

Se analizaron los resultados de los datos clínicos al objeto de calcular la sensibilidad, la especificidad y los valores de corte usando un enfoque unidimensional.

Tabla 5. Rendimiento clínico de CLL PROFILER Kit

Reordenamiento	Sensibilidad clínica (tasa de verdaderos positivos, TVP)	Especificidad clínica (tasa de verdaderos negativos, TVN)	Tasa de falsos positivos (TFP) = 1 - especificidad
<i>D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe</i>			
Deleción de D13S319	96,6 %	99,5 %	0,5 %
Trisomía 12	100 %	100 %	0 %
<i>P53/ATM Probe</i>			
Deleción de P53	100 %	100 %	0 %
Deleción de ATM	100 %	100 %	0 %

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

Página web: www.cytoCELL.com

Bibliografía

- Rossi D, *et al.*, Blood. 2013 Feb 21;121(8):1403-12
- Baliakas P, *et al.*, Leukemia. 2014;(April):1-8
- Stankovic *et al.*, Blood 2004;103(1):291-300
- Dohner *et al.*, N Eng J Med 2000;343:1910-1916
- Khanna *et al.*, Nature Genetics 1998;20(4):398-400
- Juliussen G *et al.*, N Eng J Med 1990;323:720-4
- Puiggras *et al.*, Biomed Res Int 2014;1-13
- Kasar *et al.*, Nature Communications 2015;6:1-12
- Hammarsund M *et al.*, FEBS Letters 2004;556:75-80
- Van Dyke DL *et al.*, Br J Haematology 2009;148:544-50
- Liu Y *et al.*, Oncogene 1997;15:2463-73
- Wolf S *et al.*, Hum Mol Genet 2001;10:1275-85
- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- 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.
- 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
CONT	es: Contenido

Patentes y marcas comerciales

Aquarius y CytoCELL son marcas comerciales registradas 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@cytoCELL.com
Sitio web: www.cytoCELL.com