



A Sysmex Group Company



### Instrucciones de uso

REF: LPH 087-S / LPH 087

### CLL Plus Screening Panel



SOLO PARA USO PROFESIONAL



www.cytocell.com

Más información y otros idiomas disponibles en [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

#### Limitaciones

Este producto está diseñado para detectar pérdidas o ganancias genómicas mayores que las regiones cubiertas por el clon rojo de este conjunto de sondas, entre las que se incluyen las regiones 13q14.3, *ATM*, *P53 (TP53)* y *MYB*, así como el centrómero del cromosoma 12. Es posible que con este producto no se detecten pérdidas o ganancias genómicas fuera de estas regiones ni pérdidas o ganancias 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

CLL Plus Screening Panel 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 o deleciones en la región MYB de 6q23.3 del cromosoma 6 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 del gen *P53 (TP53)*, el gen *ATM* o el marcador 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 contraíne para su visualización. A continuación, se puede observar mediante microscopía de fluorescencia la sonda hibridada sobre el material de interés.

#### Información sobre las sondas

Una selección de sondas hematológicas y una sonda satélite alfa para la LLC.

#### Alpha Satellite 12 Plus for CLL

La trisomía 12, identificada en el 20 % de los casos<sup>1</sup>, es una anomalía recurrente en la LLC y con frecuencia se presenta como la única anomalía citogenética (40-60 % de los casos con trisomía 12)<sup>2</sup>. En ausencia de otras lesiones genéticas, los pacientes con trisomía 12 se clasifican como de riesgo bajo<sup>3</sup>. Este producto también está disponible en los tamaños de kit de 5 ensayos (LPH 069-S) y kit de 10 ensayos (LPH 069) y se ha optimizado para permitir la hibridación durante la noche.

#### 13q14.3

Las deleciones que afectan a 13q14 constituyen las anomalías estructurales más frecuentes en la LLC<sup>3,4,5</sup>. 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 homocigota<sup>6</sup>. En ausencia de otras lesiones genéticas, los pacientes con deleciones de 13q14 se clasifican como de riesgo muy bajo<sup>3</sup>.

#### P53 (TP53) (17p13.1)

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<sup>3,7</sup>.

#### ATM (11q22.3)

El gen ATM (*serina/treonina cinasa ATM*), que se halla 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 ADN<sup>8</sup>. La ausencia del gen ATM, considerada un marcador de mal pronóstico de la LCC, se ha registrado en el 18 % de los pacientes con esta enfermedad<sup>9</sup>.

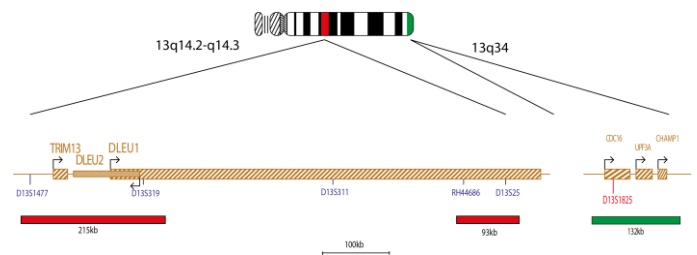
#### MYB (6q23.3)

Las deleciones del cromosoma 6q son recurrentes en la LCC. El gen MYB (*protooncogén MYB, factor de transcripción*) es esencial en la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas<sup>10,11</sup>. Se encuentra en la subbanda 6q23.3 y se utiliza como marcador de la deleción de 6q.

#### Características de las sondas

##### 13q14.3 Deletion Probe

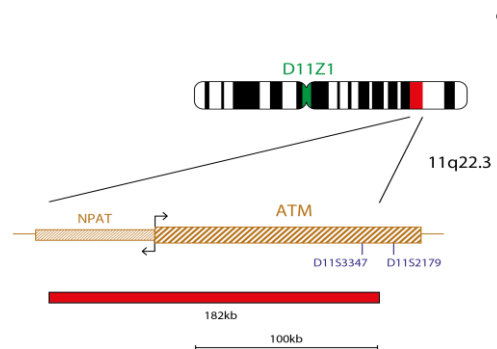
13q14.2-q14.3, en rojo  
13qter, 13q34, en verde



Las sondas 13q14.2-q14.3, marcadas en rojo, abarcan los marcadores D13S319 y D13S25. La sonda específica subteloamérica 13qter (clon 163C9), marcada en verde, permite la identificación del cromosoma 13 y actúa como sonda de control.

##### ATM Deletion Probe

ATM, 11q22.3, en rojo  
D11Z1, 11p11.1-q11.1, en verde



CMP-H006 v005.00

La sonda ATM, de 182 kb y marcada en rojo, cubre el extremo telomérico del gen NPAT y el extremo centromérico del gen ATM rebasando un poco el marcador D11S3347. El conjunto de sondas también contiene una sonda de control para el centrómero del cromosoma 11 (D11Z1) marcada en verde.

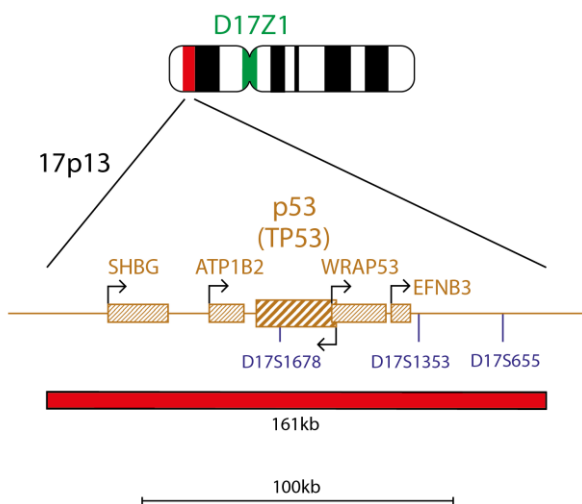
**Alpha Satellite 12 Plus for CLL**  
D12Z3, 12p11.1-q11.1, en rojo



Alpha-Satellite 12 Plus Probe es una sonda de secuencia de repetición, marcada en rojo, que reconoce la secuencia de repetición centromérica D12Z3.

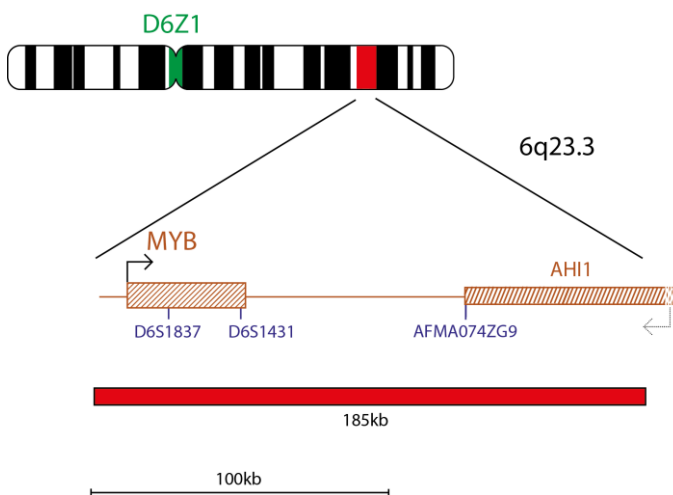
**P53 (TP53) Deletion Probe**  
P53, 17p13, en rojo  
D17Z1, 17p11.1-q11.1, en verde

CMP-H039 V007.00



La sonda p53 (TP53), de 161 kb y marcada en rojo, cubre todo el gen p53 (TP53) y las regiones flanqueantes. El conjunto de sondas también contiene una sonda de control para el centrómero del cromosoma 17 (D17Z1) que está marcada en verde.

**MYB Deletion Probe**  
MYB, 6q23.3, en rojo  
D6Z1, 6p11.1-q11.1, en verde



El conjunto de sondas MYB se compone de una sonda de 185 kb, marcada en rojo, que cubre todo el gen MYB y una región telomérica a este que incluye una porción centromérica del gen AH11. Este conjunto de sondas también contiene una sonda de control para el centrómero del cromosoma 6 (D6Z1) marcada en verde.

**Materiales suministrados**

**Sondas:** 50 µl por vial (5 ensayos) o 100 µl por vial (10 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)

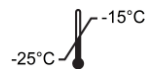
Se utiliza DAPI AntiFade como tinción de contraste (ES: 0,125 µg/ml de DAPI [4,6-diamidino-2-fenilindol]).

**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, verde y azul.
7. Si no se siguen el protocolo y el los reactivos indicados, el resultado se podría ver afectado y se podrían generar 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 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 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 <sub>máx</sub> [nm]	Emisión <sub>máx</sub> [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. 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 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 portaobjetos<sup>12</sup>.

#### 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

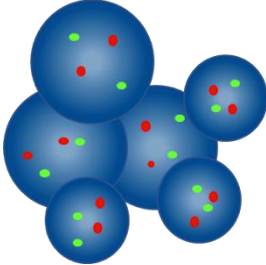
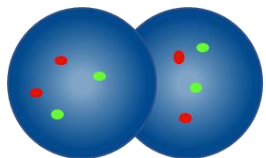
##### Evaluación de la calidad del portaobjetos

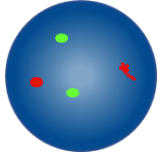
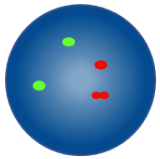
El portaobjetos no se deberá analizar si se dan las siguientes condiciones:

- 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

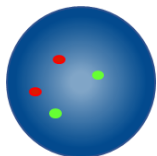
- Cada muestra debe ser analizada e interpretada por dos analistas. Cualquier discrepancia debe resolverse mediante la valoración de un tercer analista.
- Cada analista deberá estar debidamente cualificado según los criterios nacionales reconocidos.
- Cada analista deberá puntuar de manera independiente 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	
	<p>No se contabilizan: los núcleos están demasiado próximos para determinar los límites.</p>
	<p>Los núcleos que se superponen no se contabilizan: no todas las zonas de los dos núcleos son visibles.</p>

	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 señales.

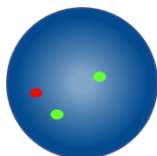
**Resultados previstos**  
**13q14.3 Deletion Probe**

Patrón previsto de señales normales

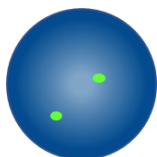


En una célula normal, se espera observar dos señales rojas y dos señales verdes (2 R, 2 V).

Patrones previstos de señales anómalas



En una célula con deleción hemicigota de 13q14.3, el patrón de señal previsto será de una señal roja y dos señales verdes (1 R, 2 V).



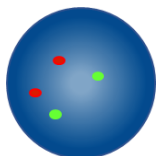
En una célula con deleción homocigota, el patrón de señal previsto será de cero señales rojas y dos señales verdes (0 R, 2 V).

En la LLC, las deleciones 13q se reconocen como heterogéneas; con este conjunto de sondas, una pequeña deleción en la región 13q puede producir una pequeña señal residual.

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

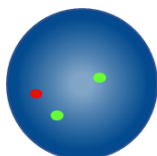
**ATM Deletion Probe**

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

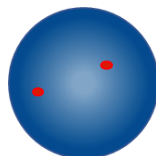


En una célula con deleción del gen ATM, el patrón de señal previsto será de una señal roja y dos señales verdes (1 R, 2 V).

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

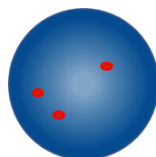
**Alpha Satellite 12 Plus for CLL**

Patrón previsto de señales normales



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

Patrón previsto de señales anómalas

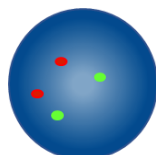


En una célula con trisomía 12 el patrón de señal previsto será de tres señales rojas (3 R).

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

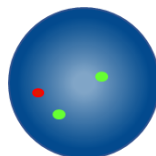
**P53 (TP53) Deletion Probe**

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

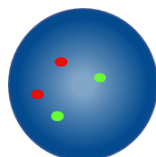


En una célula con deleción del gen P53, el patrón de señal previsto será de una señal roja y dos señales verdes (1 R, 2 V).

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

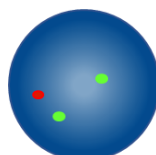
**MYB Deletion Probe**

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 deleción del gen MYB, 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

Sonda	Reactividad cruzada conocida
13q14.3 Deletion Probe	Es posible que la sonda 13qter verde muestre hibridación cruzada en el centrómero del cromosoma 19 y en los brazos cortos de otros cromosomas.
ATM Deletion Probe	Es posible que la sonda D11Z1 verde muestre hasta cuatro señales de hibridación cruzada en los cromosomas X y 17.
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	Es posible que la sonda muestre hibridación cruzada roja en los cromosomas 3, 6, 7 y 10.
P53 Deletion Probe	Es posible que la sonda D17Z1 verde muestre hibridación cruzada en los centrómeros del cromosoma 11 y X.
MYB Deletion Probe	No se ha detectado ninguna hibridación cruzada.

## 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](mailto: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 de CLL Plus Screening Panel

Kit	Sonda	Locus de interés	N.º de señales hibridadas con el locus correcto	N.º total de señales hibridadas	Especificidad (%)
13q14.3 Deletion Probe	Roja 13q14.3	13q14.3	200	200	100
	Verde 13qter	13qter, 13q34	200	200	100
ATM Deletion Probe	Roja ATM	11q22.3	200	200	100
	Verde D11Z1	11q11.1-q11.1	200	200	100
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	D12Z3 roja	12p11.1-q11.1	200	200	100
P53 Deletion Probe	Roja P53	17p13.1	200	200	100
	Verde D17Z1	17p11.1-q11.1	200	200	100
MYB Deletion Probe	Roja MYB	6q23	200	200	100
	Verde D6Z1	6p11.1-q11.1	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 Plus Screening Panel

Kit	N.º de células con patrones de señales previstos	N.º de células con señales puntuables	Sensibilidad (%)	Intervalo de confianza del 95 %
13q14.3 Deletion Probe	481	500	96,2	1,6
ATM Deletion Probe	482	500	96,4	1,0
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	487	500	97,4	1,0
P53 Deletion Probe	471	500	94,2	2,7
MYB Deletion 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 Plus Screening Panel

Kit	Patrón de señales anómalas	Índice de Youden	Corte normal (%)
13q14.3 Deletion Probe	1 R, 2 V o 0 R, 2 V	0,95	7
ATM Deletion Probe	1R, 2V	0,99	9
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	3 R	0,99	3
P53 Deletion Probe	1 R, 2 V	0,90	10
MYB Deletion Probe	1 R, 2 V	0,97	8

Los laboratorios deberán verificar los valores de corte usando sus propios datos<sup>13,14</sup>.

### 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 Plus Screening Panel

Variable	Desviación estándar (DE)				
	13q14.3 Deletion Probe	ATM Deletion Probe	Alpha Satellite 12 Plus for CLL	P53 Deletion Probe	MYB Deletion Probe
Precisión	0,72	0,38	0,72	2,63	1,09
Entre distintas muestras	0,58	0,38	0,89	2,30	1,19
Entre distintos días	0,96	0,58	0,51	2,39	1,20
Entre distintos lotes	1,40	1,27	1,27	1,68	0,90
Desviación global	1,03	1,01	1,15	2,16	1,06

### 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 Plus Screening Panel

Sonda	Sensibilidad clínica (tasa de verdaderos positivos, TVP)	Especificidad clínica (tasa de verdaderos negativos, TVN)	Tasa de falsos positivos (TFP) = 1 - especificidad
13q14.3 Deletion Probe	96,3 %	99,1 %	0,9 %
ATM Deletion Probe	100 %	99,2 %	0,8 %
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	100 %	100 %	0 %
P53 Deletion Probe	92,5 %	97,1 %	2,9 %
MYB Deletion Probe	97,8 %	99,6 %	0,4 %

### 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. Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
2. Puiggros *et al.*, Biomed Res Int 2014;1-13
3. Rossi *et al.*, Blood 2013;121(8):1403-1412
4. Juliusson G *et al.*, N Eng J Med 1990;323:720-4
5. Kasar *et al.*, Nature Communications 2015;6:1-12
6. Hammarstrand M *et al.*, FEBS Letters 2004;556:75-80
7. Baliakas P, *et al.*, Leukemia. 2014;(April):1-8
8. Stankovic *et al.*, Blood 2004;103(1):291-300
9. Dohner *et al.*, N Eng J Med 2000;343:1910-1916
10. Clappier *et al.*, Blood 2007;110(4):1251-1261
11. Stilgenbauer *et al.*, Leukemia, 1999;13:1331-1334
12. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) The *AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
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.

### 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 Cytozell Ltd.



### Cytozell 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