



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Disposición

Número:

Referencia: 1-0047-3110-006509-23-8

VISTO el Expediente N° 1-0047-3110-006509-23-8 del Registro de esta Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), y:

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones INVITROGEN ARGENTINA S.A solicita se autorice la inscripción en el Registro Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de esta Administración Nacional, de un nuevo/s Producto/s Médico/s para diagnóstico in vitro, Nombre descriptivo: 1) 902420 - CytoScan Dx Assay Kit (contents include the CytoScan Dx Array and all required CytoScan Dx Assay reagents).

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico in vitro que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización .

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99 y normas complementarias.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médico objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y sus modificatorias.

Por ello;

LA ADMINISTRADORA NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL
DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) del producto médico para diagnóstico de uso in vitro, Nombre descriptivo: 1) 902420 - CytoScan Dx Assay Kit (contents include the CytoScan Dx Array and all required CytoScan Dx Assay reagents)

de acuerdo con lo solicitado por INVITROGEN ARGENTINA S.A con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulo/s y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2024-64341283-APN-INPM#ANMAT .

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda "Autorizado por la ANMAT PM 1569-29 ", con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTICULO 4º.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5º.- La vigencia del Certificado de Autorización será de cinco (5) años, a partir de la fecha de la presente disposición.

ARTÍCULO 6º.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

Nombre descriptivo: 1) 902420 - CytoScan Dx Assay Kit (contents include the CytoScan Dx Array and all required CytoScan Dx Assay reagents)

Marca comercial: No aplica

Modelos:

Conteniendo:

- 2) 902107 – CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD R L A Reagents
- 3) 902108 – CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD T E W Reagents
- 4) 902109 - CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD F L H Reagents
- 5) 902110 - CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD S AH W PB Reagents
- 6) 902111 - CytoScan Dx Pre-PCR 15 °C – 30 °C MOD E PW Reagents
- 7) 902090 - CytoScan Dx WS A
- 8) 902091 - CytoScan Dx WS B
- 9) 902150 - CytoScan Dx Array, 6pk
- 10) 620969 – CytoScan Dx Library Files
- 11) 610525 – Chromosome Analysis Suite Dx Software

Indicación/es de uso:

1) 902420 - CytoScan Dx Assay Kit para 24 muestras: El ensayo CytoScan™ Dx es un ensayo cualitativo indicado para la detección posnatal de variaciones en el número de copias (VNC) del ADN genómico que se ha obtenido de sangre total periférica procedente de pacientes que han sido remitidos para realizar pruebas cromosómicas según sus cuadros clínicos. El ensayo CytoScan™ Dx ha sido diseñado para detectar CNV asociadas con el retraso del desarrollo, la discapacidad intelectual, las anomalías congénitas o las características dismórficas. Está previsto utilizar los resultados del ensayo junto con otros descubrimientos clínicos y diagnósticos que sean coherentes con las normas de práctica profesionales, incluida la confirmación mediante métodos alternativos, la evaluación de los padres, la evaluación genética clínica y el asesoramiento, según sea necesario. Está previsto que sean solo los profesionales sanitarios certificados en citogenética clínica o genética molecular quienes interpreten los resultados del ensayo. El ensayo ha sido diseñado para utilizarse en el sistema GeneChip™ 3000Dx. Asimismo, el ensayo se analizará en el software Chromosome Analysis Suite Dx (ChAS Dx).

Este dispositivo no está diseñado para usarse con fines diagnósticos independientes, para pruebas de preimplantación o prenatales (como para conocer el riesgo de la trisomía del par 21) o para realizar evaluaciones, evaluaciones de la población, o para detectar o evaluar anomalías genéticas adquiridas o somática

Conteniendo:

- 2) 902107 – CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD R L A Reagents: reactivos para el ensayo.
- 3) 902108 – CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD T E W Reagents: reactivos para el ensayo.
- 4) 902109 - CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD F L H Reagents: reactivos para el ensayo.
- 5) 902110 - CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD S AH W PB Reagents: reactivos para el ensayo.
- 6) 902111 - CytoScan Dx Pre-PCR 15 °C – 30 °C MOD E PW Reagents: reactivos para el ensayo.
- 7) 902090 - CytoScan Dx WS A: solución de lavado.
- 8) 902091 - CytoScan Dx WS B: solución de lavado.
- 9) 902150 - CytoScan Dx Array, 6pk: arreglos biológicos.
- 10) 620969 – CytoScan Dx Library Files: software de analisis.
- 11) 610525 – Chromosome Analysis Suite Dx Software: software de analisis.

Forma de presentación: 1) 902420 - CytoScan Dx Assay Kit para 24 muestras

Conteniendo:

- 2) 902107 – CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD R L A Reagents, conteniendo: NSP I, 40 uL; NSP I BUF, 80 uL; BSA, 25 uL; DNA LIG, 80 uL; DNA LIG BUF, 100 uL; TAQ BUF, 1500 uL; GCM, 3000 uL; DNTPS, 2100 uL; TAQ ENZ, 300 uL; NSP I ADAP, 30 uL; PCR PRIM, 660 uL.
- 3) 902108 – CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD T E W Reagents, conteniendo: TE BUF, 24 mL; NFW, 17 mL.

- 4) 902109 - CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD F L H Reagents, conteniendo: FRAG RGT, 40 uL; FRAG BUF, 1400 uL; TDT ENZ, 120 uL; TDT BUF, 470 uL; DNA LABEL RGT, 70 uL; OCR, 100 uL; HYB BUF 1, 8 mL; HYB BUF 2, 700 uL; HYB BUF 3, 350 uL; HYB BUF 4, 50 uL.
- 5) 902110 - CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD S AH W PB Reagents, conteniendo: SB 1, 17 mL; SB 2, 17 mL; AH BUF, 75 mL; NFW, 17 mL; PURIF BDS, 23 mL.
- 6) 902111 - CytoScan Dx Pre-PCR 15 °C – 30 °C MOD E PW Reagents, conteniendo: ELU BUF, 2.5 mL; PW BUF, 15 mL.
- 7) 902090 - CytoScan Dx WS A: 4 botellas x 500 ml.
- 8) 902091 - CytoScan Dx WS B: 4 botellas x 500 ml.
- 9) 902150 - CytoScan Dx Array, 6pk: 4 paquetes de 6.
- 10) 620969 – CytoScan Dx Library Files: software.
- 11) 610525 – Chromosome Analysis Suite Dx Software: software.

Período de vida útil y condición de conservación: 1) 902420 - CytoScan Dx Assay Kit

Conteniendo:

- 2) 902107 – CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD R L A Reagents: 24 meses de -25°C a -15°C
- 3) 902108 – CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD T E W Reagents: 24 meses de 2°C a 8°C
- 4) 902109 - CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD F L H Reagents: 24 meses de -25°C a -15°C
- 5) 902110 - CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD S AH W PB Reagents: 24 meses de 2°C a 8°C
- 6) 902111 - CytoScan Dx Pre-PCR 15 °C – 30 °C MOD E PW Reagents: 24 meses de 15°C a 30°C
- 7) 902090 - CytoScan Dx WS A: 24 meses de 15°C a 30°C
- 8) 902091 - CytoScan Dx WS B: 24 meses de 15°C a 30°C
- 9) 902150 - CytoScan Dx Array, 6pk: 24 meses de 2°C a 8°C
- 10) 620969 – CytoScan Dx Library Files: no aplica
- 11) 610525 – Chromosome Analysis Suite Dx Software: no aplica

Nombre del fabricante:

AFFYMETRIX, INC.

Lugar de elaboración:

3450 Central Expressway, Santa Clara, California - 95051
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

1-0047-3110-006509-23-8

N° Identificadorio Trámite: 53338

Digitally signed by PEARSON Enriqueta María
Date: 2024.07.04 17:21:47 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.07.04 17:21:49 -03:00

Ensayo CytoScan™ Dx
Instrucciones de uso

CE IVD

Índice

Uso previsto	2
Resumen y explicación de la prueba.....	2
Principios del procedimiento.....	2
Limitaciones	3
Advertencias y precauciones.....	4
Precauciones.....	4
Antes y después de la PCR.....	4
Operaciones incorrectas.....	5
Operaciones correctas.....	5
Almacenamiento.....	5
Recogida y almacenamiento de muestras.....	5
Materiales.....	6
Componentes del ensayo CytoScan Dx.....	6
Procedimiento de prueba	8
Controles	8
Procedimiento.....	8
1. Preparar el ADNg	8
2. Digestión de la enzima de restricción	9
3. Ligación	10
4. PCR.....	11
5. Purificación del producto de PCR.....	13
6. Cuantificación	15
7. Fragmentación.....	16
8. Marcaje.....	17
9. Mezcla de hibridación.....	18
10. Lavar, teñir y escanear arrays	21
11. Control de calidad durante el proceso	23
Específico de GeneChip™ System 3000Dx	24
Informes	24
Interpretación de las pruebas; CC	24
Resultados esperados.....	25
Características de rendimiento analíticas.....	26
Reproducibilidad analítica	26
Precisión analítica	34
Rendimiento de las CNV notificadas en el rango inferior del ensayo	40
Límite de detección-entrada de ADN.....	42
Límite de detección-mosaicismo.....	42
Especificidad analítica	42
Contaminación cruzada	42
Contaminación cruzada	43
Sustancias interferentes	43
Características de rendimiento clínico	43
Bibliografía	46
Símbolo	46
Información sobre seguridad	46
Fabricante y soporte.....	47
Representante autorizado	47
MARCAS COMERCIALES y derechos de autor	47

Uso previsto

El ensayo CytoScan™ Dx es un ensayo cualitativo indicado para la detección posnatal de variaciones en el número de copias (VNC) del ADN genómico que se ha obtenido de sangre total periférica procedente de pacientes que han sido remitidos para realizar pruebas cromosómicas según sus cuadros clínicos. El ensayo CytoScan™ Dx ha sido diseñado para detectar CNV asociadas con el retraso del desarrollo, la discapacidad intelectual, las anomalías congénitas o las características dismórficas. Está previsto utilizar los resultados del ensayo junto con otros descubrimientos clínicos y diagnósticos que sean coherentes con las normas de práctica profesional, incluida la confirmación mediante métodos alternativos, la evaluación de los padres, la evaluación genética clínica y el asesoramiento, según sea necesario. Está previsto que sean solo los profesionales sanitarios certificados en citogenética clínica o genética molecular quienes interpreten los resultados del ensayo. El ensayo ha sido diseñado para utilizarse en el sistema GeneChip™ 3000Dx. Asimismo, el ensayo se analizará en el software Chromosome Analysis Suite Dx (ChAS Dx).

Este dispositivo no está diseñado para usarse con fines diagnósticos independientes, para pruebas de preimplantación o prenatales (como para conocer el riesgo de la trisomía del par 21) o para realizar evaluaciones, evaluaciones de la población, o para detectar o evaluar anomalías genéticas adquiridas o somáticas.

Resumen y explicación de la prueba

Desde hace tiempo, el retraso del desarrollo y la discapacidad intelectual (RD/DI) se han asociado con mutaciones cromosómicas [1]. En 1959 se identificó la trisomía del par 21 (síndrome de Down) a través de un análisis del cariotipo de los individuos afectados y, desde entonces, gracias a este análisis, se han podido identificar numerosos síndromes. La introducción de la hibridación fluorescente in situ (FISH) desempeñó un papel importante en la identificación de otras anomalías relacionadas con RD/DI, especialmente las deleciones subteloméricas y las duplicaciones. Más recientemente, los análisis del genoma completo han esclarecido los cambios submicroscópicos asociados con RD/DI. Los chips genómicos (que con frecuencia se denominan microarrays citogenéticos o citogenómicos [CMA]) son herramientas que se emplean para evaluar el número de copias (NC) de ADN en el genoma completo [2]. Se entiende como CNV un segmento de ADN que, en su tamaño, tiene un número de copias distinto en comparación con genoma de referencia representativo [3]. El término CNV per se no implica trascendencia clínica. Por ejemplo, existen variaciones en el número de copias de individuos que aparentemente están sanos. Por lo tanto, las CNV se clasifican como benignas, patógenas y de trascendencia clínica incierta (variante de trascendencia incierta o VOUS). Asimismo, las CNV pueden ser una pérdida del número de copias (deleción) o un aumento del número de copias (duplicación) y se debe especificar el tipo de CNV para esclarecer su naturaleza. La identificación de cambios específicos en el número de copias en pacientes afectados en comparación con los sujetos de control ha traído consigo un aumento rápido en el descubrimiento de nuevos síndromes de microdeleción y microduplicación asociados con RD/DI [1]. Varios estudios amplios han abordado la importancia general de los cambios en el número de copias en la metodología diagnóstica del RD/DI. Además, ha quedado claro que los microarrays mejoran el rendimiento diagnóstico [4-7].

Miller et al. [8] analizaron las pruebas del uso de CMA como prueba inicial para investigar las CNV en pacientes que presentaban RD/DI o varias anomalías congénitas. Su recomendación de utilizar CMA como prueba inicial se fundamentaba en estudios de 21.698 pacientes remitidos por los trastornos anteriormente indicados. En ellos, el rendimiento diagnóstico aumentó hasta el 12,2 %, aproximadamente un 10 % más que cuando se utilizaba el cariotipado con bandejo G solo. Tras examinar a 36.325 pacientes con RD/DI, Hochstenbach et al. [6] también recomendaron que las CMA deberían ser la prueba inicial en este grupo de pacientes. Basándose en la interpretación de los datos de su estudio, se encontró una anomalía patogénica en el 19 % de los pacientes. Hoy en día, el Colegio Estadounidense de Genética Médica (AMCG) y la International Collaboration for Clinical Genomics (ICCG) recomiendan las CMA para evaluar el número de copias como prueba de primera línea en la evaluación posnatal inicial de individuos con múltiples anomalías que no sean específicas de un síndrome genético bien definido o que aparentemente presentan RD/DI no sindrómicos [3,8]. Se recomienda realizar un seguimiento adecuado de los casos en los que la CMA ha identificado un desequilibrio cromosómico, así como incluir estudios citogénicos o de FISH del paciente, evaluaciones de los padres, evaluaciones clínicas y asesoramiento genético.

Además de identificar cambios en el número de copias, las CMA son capaces de detectar desequilibrios alélicos mediante la interrogación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y pueden identificar anomalías de copia neutra, como tramos largos de homocigosis. Las grandes regiones de homocigosis (ausencia [AOH] o pérdida de heterocigosis [LOH]) que, en conjunto, superan los 3 Mb en los autosomas se pueden asociar a una disomía uniparental o consanguinidad y estas dos pueden suponer un gran riesgo para los trastornos autosómicos recesivos [3]. Los análisis con microarrays también pueden ayudar a caracterizar las translocaciones a nivel molecular; además, es posible que el análisis molecular revele que las translocaciones que aparentemente están equilibradas a nivel microscópico están desequilibradas [9]. Varios estudios han demostrado que alrededor de un 20 % de los individuos con una translocación aparentemente equilibrada (de novo o familiar) ha perdido o aumentado su material genético, según lo demostró el CMA.

Principios del procedimiento

Los CMA que se usan para evaluar el número de copias del ADN (también llamados microarrays citogenómicos) son herramientas de diagnóstico útiles que ahora se recomiendan como pruebas iniciales para la evaluación posnatal de individuos con RD/DI o varias anomalías congénitas. El ensayo CytoScan Dx proporciona una cobertura del genoma completo para detectar el número de copias a una resolución más alta que el análisis del cariotipo convencional. Además, permite una interrogación genómica más exhaustiva con un solo ensayo, en comparación con el análisis convencional de FISH. El array CytoScan™ Dx contiene aproximadamente 2,7 millones de marcadores distribuidos por el genoma, una media de 880 bases aparte en las regiones génicas y 1.700 bases aparte en las regiones no génicas (Tabla 1). El microarray contiene aproximadamente 2.696.550 marcadores funcionales. Además de contener información confirmatoria para avalar la detección de CNV, los patrones de SNP permiten elucidar el equilibrio alélico (por ejemplo, el patrón de descendencia se desvía de los patrones de descendencia mendeliana esperados). Se escogió el 1,95 millón de marcadores no polimórficos únicos para proporcionar una cobertura genómica general y centrar la atención en los genes de RefSeq, genes de la

OMIM y las regiones citogenéticamente relevantes que se percibieron en el momento del diseño. La alta densidad de sondas en el array CytoScan Dx permite que la evaluación del número de copias esté basado en los múltiples marcadores adyacentes, lo cual mejora la precisión de la interpretación. Tanto las sondas de SNP como las no polimórficas tienen una longitud de 25 pb.

Tabla 1. Especificaciones de cobertura del array CytoScan DX.

Marcadores para análisis de número de copias	
Número total de marcadores de número de copias	2.696.550
– Número de marcadores no polimórficos	1.953.246
– Número de marcadores de SNP	743.304
Número total de marcadores de SNP	749.157
Constructo genómico	hg19
Marcadores autosómicos	2.491.915
Marcadores pseudoautosómicos	4.624
Marcadores intragénicos	1.286.015
Marcadores intergénicos	1.410.535
Espacio medio de los marcadores (pares de bases)	
Intragénicos (entre los siguientes genes)	880
– Genes patológicos de la OMIM	659
– Genes patológicos del cromosoma X de la OMIM	486
– Genes de RefSeq	880
Intergénicos (cadena principal no génica)	1.737
Generales (cadena principal génica y no génica)	1.148

El ensayo CytoScan Dx se realiza en los siguientes pasos: (1) Se aísla el ADNg de la sangre periférica y el ADNg aislado se digiere con la enzima restricción *NspI*; (2) El ADNg digerido se liga a los adaptadores *NspI* y se amplifica en una PCR múltiple para producir amplicones optimizados en el rango objetivo de 150-2.000 pb; (3) Los productos de PCR amplificados se purifican y después se fragmentan aleatoriamente con DNasa I para generar especies en el rango objetivo de 25-125 pb, los cuales son óptimos para hibridar a sondas de 25 mer; (4) Se visualizan los intermediarios de la reacción mediante electroforesis en gel después de la PCR y los pasos de fragmentación para confirmar una distribución de tamaño correcta; (5) El producto de ADN final se etiqueta añadiendo una base biotinilada modificada y se hibrida a arrays CytoScan Dx; (6) Los arrays se lavan secuencialmente y se tiñen con una combinación de tinte conjugado de estreptavidina y un anticuerpo biotinilado de antiestreptavidina en la estación de fluidos GeneChip™ 450Dx; (7) Los arrays lavados se escanean con el escáner GeneChip™ 3000Dx para obtener la intensidad de señal de cada función del array que contiene cientos de miles de réplicas de la misma sonda. Tras este paso, el AMDS resume los datos de la intensidad de la sonda y todas sus réplicas.

El ChAS Dx se utiliza para analizar y visualizar los datos. La intensidad de la señal del ADN hibridado de la muestra del paciente se compara con el ADN de referencia, que, de media, tiene más de 400 muestras de individuos fenotípicamente sanos. El ratio de la intensidad de la sonda del paciente frente a la intensidad de referencia se expresa en un ratio log2, el cual representa la intensidad relativa de cada marcador. De los datos de la intensidad relativa, se calcula un valor discreto del número de copias que se muestra como el estado del número de copias del marcador. Los estados del número de copias no enteros se calculan y se muestran como el rastreo suave de la señal, el cual se puede usar para respaldar una interpretación de un aumento o pérdida del mosaico. En las pistas de alelos también se puede visualizar las intensidades del alelo A y B del marcador de SNP. La información de las pistas de alelos se puede utilizar para confirmar regiones CNV y regiones de LOH (AOH). Las pistas de los alelos muestran tres bandas (AA, BB y BB) en regiones diploides normales, cuatro bandas (AAA, AAB, ABB y BBB) en regiones triploides y dos bandas (A y B) en regiones haploides. Los marcadores de SNP también se analizan en busca de largos tramos contiguos de homocigosis, los cuales se visualizan en la pista de LOH (AOH).

Limitaciones

- Las regiones de CNV más pequeñas que ChAS Dx determina son 25 kb y 25 marcadores para las pérdidas y 50 kb y 50 marcadores para los aumentos. En este rango de tamaño, la reproducibilidad de las pérdidas del número de copias entre 25 y 50 kb es de 73,4 %-81 % y la reproducibilidad de los aumentos del número de copias entre 50 y 75 kb es de 67,2 %-78,8 % (consulte el rendimiento analítico en la Tabla 18A). No se ha evaluado el rendimiento del ensayo en CNV con un tamaño o número de marcadores inferior a estas configuraciones para informar.
- La precisión general de las regiones (excluyendo las regiones hipervariables definidas por la compañía) fue del 97 % para las pérdidas y del 79,1 % para los aumentos cuando se comparó con los métodos compuestos validados.
- Es posible que no se detecte de forma fiable el número de copias del mosaico <20 %, ya que la sensibilidad de la detección se ve afectada por el tamaño de la CNV.
- La pérdida (ausencia) de heterocigosis (LOH/AOH) tiene una configuración de filtro de 3 Mb. No se ha evaluado el rendimiento del ensayo en una LOH inferior a esta configuración para informar.
- Thermo Fisher Scientific ha identificado las regiones cromosómicas que se enumeran en la Tabla 2 como regiones hipervariables para el ensayo CytoScan Dx y como regiones que tienden a ser polimórficas en individuos fenotípicamente sanos. Además, por lo general, contienen pérdidas y aumentos benignos en el número de copias. En total, estas regiones representan un tamaño de aproximadamente 3,6 Mb o de aproximadamente 0,1 % del genoma humano completo (aproximadamente 3×10^9 pb). Es posible que las regiones que se enumeran en la Tabla 2 tengan una reproducibilidad y precisión inferiores usando el ensayo CytoScan Dx que en cualquier otra parte del genoma.

- El ensayo CytoScan Dx no puede identificar las reordenaciones cromosómicas equilibradas, tales como las translocaciones o las inversiones.
- Se recomienda confirmar los resultados del microarray utilizando la PCRc, FISH u otro enfoque.
- Los resultados del ensayo CytoScan DX se deben interpretar junto con otros datos clínicos y de laboratorio. Está previsto que sean los profesionales sanitarios certificados en citogenética clínica o genética molecular quienes interpreten los resultados del ensayo.
- Thermo Fisher Scientific no ha evaluado o comprobado los enlaces de ChAS Dx que llevan a bases de datos externas.
- El ensayo ha sido validado para utilizarse con sangre total periférica anticoagulada con heparina o EDTA. No se ha validado para otro tipo de muestra.
- Cuantifique el ADN con un espectrofotómetro. Verifique que el A260/A280 de la muestra de ADN es 1,7-2,1 (se permite redondear los números). Se ha validado este ensayo con una muestra de ADN de 250 ng. Los resultados del ensayo no son fiables con muestras de ADN inferiores a 10 ng.
- El ensayo CytoScan Dx está limitado a trabajadores que hayan recibido formación sobre este ensayo.

Tabla 2. Lista de regiones hipervariables del genoma humano definidas por la compañía (constructo hg19)

Región cromosómica	Referencia	Límites	Tamaño de la región (en bases)
1q44	[10]	248.681.754-248.835.053	153.300 pb
5q35.3	[10]	180.376.952-180.432.918	55.967 pb
7p14.1	[11]	38.273.345-38.419.181	145.837 pb
8p11.22	[10]	39.226.075-39.390.890	164.816 pb
11q11	[10]	55.347.529-55.481.854	134.326 pb
14q11.2	[12]	22.329.745-23.005.312	675.568 pb
14q32.33	[12]	106.035.612-107.297.169	1.261.558 pb
17q21.31	[12]	44.107.114-44.854.730	747.617 pb
22q11.22	[12]	22.992.312-23.260.235	267.924 pb

Advertencias y precauciones

 **Siga las precauciones universales para los procedimientos para laboratorio y ensayos, así como los de desecho de residuos. Siga la normativa federal, estatal, local y nacional.**

Para obtener más información sobre advertencias, precauciones y procedimientos, consulte:

Guía de usuario del Affymetrix™ Molecular Diagnostics Software

Guía de usuario del sistema GeneChip™ 3000Dx

Guía de usuario del ensayo CytoScan™ Dx

Guía de usuario del software Chromosome Analysis Suite Dx

Visite la página web (www.affymetrix.com/IVD) para ver todas las etiquetas, incluidas estas instrucciones de uso y todos los manuales (*Guía de usuario del ensayo CytoScan™*, *Guía de usuario del software Chromosome Analysis Suite Dx*, *Guía de usuario del Affymetrix™ Molecular Diagnostics Software*, *Guía de usuario del módulo de software del ensayo CytoScan™ Dx*, *Guía de usuario del sistema GeneChip™ 3000Dx*), los materiales de formación del ensayo CytoScan™ Dx para la certificación de usuarios, las hojas de datos de seguridad (SDS) con todos los riesgos de los reactivos del ensayo CytoScan™, el software Chromosome Analysis Suite Dx (ChAS Dx) para descargar y la listas de reactivos certificados y lotes de arrays. Se puede obtener una copia impresa de estos documentos de manera gratuita si lo solicita. Para ello, póngase en contacto con Thermo Fisher Scientific en el correo electrónico o número de teléfono que aparece en la página 45.

Precauciones

Es necesario llevar a cabo prácticas de laboratorio adecuadas, ya que un producto de PCR amplificado anteriormente es la potencial fuente de contaminación más probable. Tenga cuidado para evitar la contaminación cruzada durante todos los pasos de este procedimiento. Siga los pasos indicados a continuación:

Antes y después de la PCR

- Siga los procedimientos habituales y el flujo de trabajo unidireccional para el área de laboratorio anterior a la PCR.
- Utilice el equipo adecuado para cada zona, por ejemplo, termocicladores, microcentrifugas, pipetas y puntas, cubos de hielo, etc.
- Coloque todos los reactivos y las soluciones madre en el área de uso. *No mueva el equipo de la sala anterior a la PCR a la sala posterior a la PCR y viceversa, por ejemplo, los cubos de hielo, las pipetas, etc.*
- Utilice copias separadas del procedimiento de ensayo en las zonas anteriores y posteriores a la PCR.
- Abra las soluciones madre del iniciador (con la etiqueta «PCR PRIM») y el adaptador (con la etiqueta «NSP I ADAP») de la PCR solo en una cabina de flujo laminar para evitar la contaminación.
- Siga los procedimientos para volver a entrar a la sala limpia anterior a la PCR de la sala posterior a la PCR.

Operaciones incorrectas

- No utilice el kit una vez pasada la fecha de caducidad.
- No utilice reactivos tras más de 4 ciclos de congelación-descongelación.
- No utilice reactivos si han estado abiertos más de 60 días.
- No utilice agua que no sea el Agua sin nucleasas (con la etiqueta «NFW») que se suministra con el kit de Thermo Fisher Scientific.
- No reutilice los cierres para placas.
- No mezcle los números de lote de los kits (array y reactivo).

Operaciones correctas

- Utilice un ADN genómico bicatenario que no esté degradado, contaminado y que esté libre de inhibidores de la PCR. Compruebe su concentración mediante el método de cuantificación específico para el ADNbc.
- Siga las instrucciones del uso de batas, etc.
- Utilice puntas de pipeta libres de nucleasas y emplee pipetas con barreras para aerosol.
- Deje enfriar el equipo esencial antes de usarlo, como los bloques refrigeradores y los refrigeradores de los reactivos.
- Mantenga todos los tubos, mezclas maestras y soluciones con las que esté trabajando en bloques refrigeradores fríos con hielo.
- Mantenga las enzimas en un rango de temperatura de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ mientras sea necesario. Después, colóquelas de inmediato en un refrigerador de reactivos enfriado en un rango de temperatura de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Cuando se indique, mantenga los reactivos enfriados en un rango de temperatura de $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y colóquelos sobre hielo mientras los usa. Cuando se descongelen, mézclelos bien y centrifúgelos. Después, colóquelos de inmediato sobre hielo y úselos en un periodo máximo de 1,5 horas.
- Mantenga la coherencia de las muestras. Asegúrese de que todas las transiciones a la temperatura de incubación son rápidas y están bien controladas. La actividad enzimática es una función de temperatura.
- Tratamiento de las enzimas:
 - Mantenga el tubo en un refrigerador entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - Centrifúguelo rápido y mézclelo en vórtex durante 1-3 segundos.
 - Vuelva a colocarlo en el refrigerador para usarlo.
- Mantenga una temperatura entre $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura ambiente) durante el procedimiento.
- Utilice siempre mezclas maestras recién preparadas.
- Utilice solo el agua sin nucleasas (con la etiqueta «NFW») que se suministra con el kit de Thermo Fisher Scientific.
- Las propiedades físicas y toxicológicas de los productos de este kit no se han investigado en profundidad. Se recomienda llevar a cabo prácticas de laboratorio cautelosas y utilizar equipo de protección general para el laboratorio (protección para los ojos, guantes y bata de laboratorio) cuando se trabaja con estos o con cualquier reactivo o producto químico de laboratorio. Consulte la hoja de datos de seguridad para obtener más información.
- Siga las instrucciones para cerrar las placas, mezclar en vórtex y centrifugar. Asegúrese de que las placas están cerradas herméticamente para evitar la pérdida de muestras y la contaminación cruzada. Utilice siempre sellos nuevos.
- Pipetee con precisión utilizando pipetas calibradas.
- Utilice solo los puntos de detención especificados para el ensayo. Consulte la *Guía de usuario del ensayo CytoScan™ Dx*.

Almacenamiento

- Siga las instrucciones de uso, las etiquetas del productos y las instrucciones de la *Guía de usuario del ensayo CytoScan™ Dx* para almacenar y manipular reactivos.
- Consulte el apartado *Principios activos para los reactivos del CytoScan™ Dx*. Almacene:
 - Los principios activos Mod R L A y Mod F L H entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (no los almacene entre $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$).
 - Los principios activos Mod T E W y MOD S A H W PB entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - Los principios activos Mod E PW y los reactivos de limpieza entre $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura ambiente).

Recogida y almacenamiento de muestras

Está previsto utilizar el array CytoScan Dx con ADN_g aislado de sangre completa. No se ha evaluado el rendimiento en ADN_g aislado de otros tejidos o fuentes.

Las pruebas han demostrado que el ADN_g que se proporciona al laboratorio tiene una estabilidad de 3 meses tras su preparación. Antes de usarlo para las pruebas, el ADN_g preparado se puede almacenar a temperatura ambiente (entre $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$), refrigerado (entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$), o congelado (entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$), con un máximo de 4 ciclos de congelación-descongelación. Tenga cuidado para evitar una posible contaminación causada por los productos de la fase posterior a la PCR.

Nota: Se deben cumplir los requisitos federales de envasado cuando se transportan muestras por medios terrestres y aéreos.

Materiales

Componentes del ensayo CytoScan Dx

Los reactivos, el material fungible y los instrumentos para el array CytoScan Dx se indican en las Tablas 3-10.

Tabla 3. Kit del ensayo CytoScan Dx (n.º de cat. 902420), necesario y suministrado (suficiente para 24 muestras).

Nombre de la etiqueta	Principios activos
CytoScan™ Dx Pre-PCR –20 °C (MOD R L A)	
⚠ NSP I, 40 µl	>10.000 U/ml, enzima Nsp I, tampón Tris-HCl, KCl, ditiotreitól, EDA, BSA, glicerol, Triton X-100™
NSP I BUF, 80 µl	Tampón Tris-HCl, NaCl, MgCl ₂ , ditiotreitól
⚠ BSA, 25 µl	BSA, KPO ₄ , NaCl, EDTA, glicerol
⚠ DNA LIG, 80 µl	>400.000 U/ml, ADN ligasa de T4, Tris-HCl, KCl, ditiotreitól, EDTA, glicerol
DNA LIG BUF, 100 µl	Tris-HCl, MgCl ₂ , ditiotreitól, 1 mM de ATP
TAQ BUF, 1.500 µl	Tampón de tricina-KOH, KCl, MgCl ₂ , BSA ¹
GCM, 3.000 µl	Trimetilglicina ¹
DNTPS, 2.100 µl	10 mM de cada uno de los siguientes dATP, dCTP, dGTP, dTTP ¹
⚠ TAQ ENZ, 300 µl	Enzima TAQ, anticuerpo TAQstart, glicerol, Tris-HCl, EDTA, Tween-20™, Nonidet P-40™ ¹
NSP I ADAP, 30 µl	50 µM de par de oligonucleótido adaptador
PCR PRIM, 660 µl	100 µM de oligonucleótido PCR Primer
CytoScan™ Dx Pre-PCR 2 °C a 8 °C (MOD T E W)	
TE BUF, 24 ml	Tampón Tris, EDTA
NFW, 17 ml	Agua sin nucleasas
CytoScan™ Dx Post-PCR –20 °C (MOD F L H)	
⚠ FRAG RGT, 40 µl	DNasa I (páncreas bovino), Tris-HCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ , glicerol
⚠ FRAG BUF, 1.400 µl	Tris base, acetato de potasio, acetato de magnesio, ditiotreitól
⚠ TDT ENZ, 120 µl	Enzima desoxinucleotidil transferasa terminal, tampón de fosfato de potasio, NaCl, ditiotreitól, glicerol
⚠ TDT BUF, 470 µl	500 mM de cacodilato, cloruro de cobalto, ditiotreitól
DNA LABEL RGT, 70 µl	30 mM de reactivo de marcaje de ADN GeneChip, Tris-HCl, EDTA
OCR, 100 µl	100 nM de oligonucleótidos, ADN de arenque, Tris-HCl, EDTA
⚠ HYB BUF 1, 8 ml	Tampón MES, TMAC, DMSO
HYB BUF 2, 700 µl	EDTA, BSA acetilada, Ficoli™, PVP-90
HYB BUF 3, 350 µl	EDTA, 0,432 mg/dl de ADN Cot-1 humano, 4,32 mg/dl de ADN de esperma de arenque
HYB BUF 4, 50 µl	Tween-20
CytoScan™ Dx Post-PCR 2 °C a 8 °C (MOD S AH W PB)	
SB 1, 17 ml	Tampón MES, NaCl, BSA acetilada, Ficoli™, PVP-90, Tween-20, azida de sodio al 0,01 %, estreptavidina-ficoeritrina
SB 2, 17 ml	Tampón MES, NaCl, BSA acetilada, Ficoli™, PVP-90, Tween-20, azida de sodio al 0,01 %, IgG de cabra biotinilada con antiestreptavidina
AH BUF, 75 ml	Tampón MES, NaCl, Tween-20, azida de sodio al 0,02 %
NFW, 17 ml	Agua sin nucleasas
PURIF BDS, 23 ml	Microesferas AMPure XP ¹ , azida de sodio a <0,1 %
CytoScan™ Dx Post-PCR 15 °C a 30 °C (MOD E PW)	
ELU BUF, 2,5 ml	Tampón Tris
PW BUF, 15 ml	Agua sin nucleasas
Lavado A	
WS A, 500 ml	Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O, EDTA, NaCl, Tween-20
Lavado B	
WS B, 500 ml	Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O, EDTA, NaCl, Tween-20
Arrays CytoScan™ Dx	

¹ Fórmula patentada

Tabla 4. Reactivos de Applied Biosystems necesarios no suministrados.

Artículo
Marcador de ADN, marcadores para PCR 50-2.000 pb. Los marcadores de PCR son una mezcla de 8 bandas de ADN cuyo tamaño varía entre 50 y 2.000 pb en una forma lista para cargar que se suministra en un tampón de carga de gel. La cantidad recomendada para la carga (5 µl) produce bandas de alta resolución para que sea fácil calcular el tamaño de los productos de PCR. Los tintes de seguimiento no interfieren con la iluminación UV de los geles teñidos con bromuro de etidio. Fragmentos: 2.000 bp, 1.500 bp, 1.000 bp, 750 bp, 500 bp, 300 bp, 150 bp, 50 bp.

Tabla 5. Reactivos que no son de Applied Biosystems necesarios no suministrados.

Artículo
Etanol absoluto
Lejía; hipoclorito de sodio preparado a base de una solución concentrada sin aditivos a una concentración final de trabajo de 0,525 % (v/v).
Marcador de ADN, marcadores de fragmentación 25-125 pb

Tabla 6. Material fungible necesario no suministrado.

Artículo
Tubo de microcentrífuga sin nucleasas, antiadherente, estéril, de polipropileno, ámbar, 1,5 ml
Tubo de microcentrífuga sin nucleasas, antiadherente, estéril, de polipropileno, azul, 1,5 ml
Tubo de microcentrífuga sin nucleasas, antiadherente, estéril, de polipropileno, transparente, 1,5 ml
Tubo de centrífuga sin nucleasas, estéril, de polipropileno, 15 ml
Tubo de centrífuga sin nucleasas, estéril, de polipropileno, 50 ml
Etiquetas redondas adhesivas, 12,7 mm y 9,52 mm
Gel de agarosa de TBE, 2 %
Gel de agarosa de TBE, 4 %
Tinte de carga para electroforesis con gel
Tiras de tubo sin nucleasas, esterilizadas, con 8 pocillos, 0,2 ml, de polipropileno
Película adhesiva transparente certificada para PCR para placas de 96 pocillos
Puntas de pipeta con barreras para aerosol, sin nucleasas, puntas con filtro de 1.000 µl
Puntas de pipeta con barreras para aerosol, sin nucleasas, puntas con filtro de 20 µl
Puntas de pipeta con barreras para aerosol, sin nucleasas, puntas con filtro de 200 µl
Placa, DO para espectrofotómetro UV, 96 pocillos (necesaria si se usa un espectrofotómetro con microplacas)
Placas sin faldón de 96 pocillos, para PCR
Reservorio para reactivos, 25 ml
TBE para electroforesis

Tabla 7. Instrumentos de Applied Biosystems necesarios no suministrados.

Artículo	N.º de cat.
Sistema GeneChip™ 3000Dx	00-0334
- Escáner GeneChip™ 3000Dx con autocargador Dx	—
- Estación de fluidos GeneChip™ 450Dx	—
- Estación de trabajo con software de diagnóstico molecular Affymetrix™ (AMDS)	—

Tabla 8. Se necesita software de Applied Biosystems.

Artículo	PN
Software de diagnóstico molecular Affymetrix™ (AMDS)	610449
Módulo de software del ensayo CytoScan™ Dx (CytoScan™ Dx ASM)	610446
Software Chromosome Analysis Suite Dx (ChAS Dx)	610525

Tabla 9. Equipo necesario no suministrado.

Artículo
Ordenador con sistema operativo Windows 7 de 64 bits de Microsoft®
Horno de hibridación
Gradilla para tubos magnética
Pipetas monocal y multicanal
Espectrofotómetro UV/VIS monocal o con lector de placas
Termociclador

Artículo
Agitador vórtex con inserto de espuma para microtubos y cabezal de la plataforma de 15,24 cm para la pieza de espuma

Tabla 10. Software necesario no suministrado.

Artículo
Adobe® u otro lector de PDF (si no está ya instalado en la estación de trabajo del sistema operativo Windows); versión 3.2.2 o superior

Procedimiento de prueba

Controles

Utilice un control positivo en cada análisis. Utilice al menos un control positivo con anomalías que se puedan determinar con precisión. Los controles positivos no están incluidos en el kit.

Utilice un control negativo. Utilice un pocillo de blanco con TE BUF.

Procedimiento

1. Preparar el ADNg

Definición de los rangos de temperatura:

Congelar De -25 °C a -15 °C

Hielo: De 2 a 8 °C

Temperatura De 15 a 30 °C

ambiente:

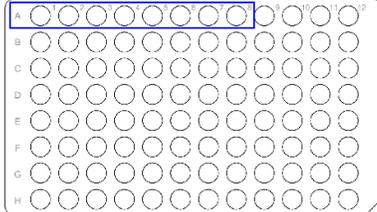
A. Diluir la solución madre de ADNg en la concentración con la que va a trabajar

1. Coloque la placa de 96 pocillos en la mitad superior del bloque refrigerador sobre hielo.
2. Deje el ADNg a 15-30 °C (temperatura ambiente) hasta que se descongele (≤30 minutos). Después, colóquelo en el bloque refrigerador sobre hielo. Utilícelo en un periodo de una hora.
3. Mezcle en vórtex las muestras de ADNg durante tres segundos.
4. Centrifugue a 650 x g durante un minuto. Después, coloque las muestras en el bloque refrigerador.
5. Diluya cada muestra en 50 ng/μl con TE BUF en pocillos separados de la placa de 96 pocillos (use el método de cuantificación específico de la bicatenación para determinar la concentración de la muestra).
6. Cierre herméticamente la placa.
7. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
8. Colóquelas en el bloque refrigerador.

B. Colocar una parte del ADNg preparado en la placa del ensayo

B1. Establecer la zona de trabajo

1. Marque la placa de 96 pocillos.



2. Coloque la placa en la mitad inferior del bloque refrigerador.
3. Mezcle en vórtex el ADNg durante tres segundos y, después, centrifúguelo.
4. Transfiera 5 μl de la primera muestra al pocillo A1 de la placa de digestión y ligación. Después, transfiera todas las muestras de la misma manera.
5. Cierre herméticamente la placa de digestión y ligación con un cierre nuevo y centrifugue a 650 x g durante un minuto.

2. Digestión de la enzima de restricción

A. Preparar los reactivos, el equipo y el material fungible

Encienda el termociclador para precalentar la tapa. Deje el bloque a temperatura ambiente.

A1. Establecer la zona de trabajo

1. Coloque el bloque refrigerador y el agua en hielo.
2. Coloque la tira de 8 tubos en la mitad superior del bloque refrigerador. (use la tira de 8-12 tubos si hay más de 8 muestras).
3. Ponga la etiqueta «Dig.» en el tubo de 1,5 ml y colóquelo en el bloque refrigerador.
4. Corte la película adhesiva en tiras lo suficientemente anchas como para cerrar 8 o 12 tubos en tiras.

B. Preparar los reactivos y el ADNg

B1. Preparar el ADNg

1. Descongélalo a temperatura ambiente (≤ 30 minutos) y colóquelo inmediatamente sobre el hielo:
 - NSP I BUF
 - BSA
2. Establezca la reacción en un periodo de una hora.
3. Prepare el NSP I BUF y la BSA:
 - a. Mezcle en vórtex cada muestra tres veces durante un segundo.
 - b. Centrifugue rápido durante tres segundos.
 - c. Colóquelas en el bloque refrigerador sobre el hielo.
4. Coloque el NFW sobre el hielo.

C. Preparar la mezcla maestra de digestión

Prepare y almacene todos los reactivos, los tubos y el bloque refrigerador sobre el hielo. Sáquelo en un periodo de 10 minutos.

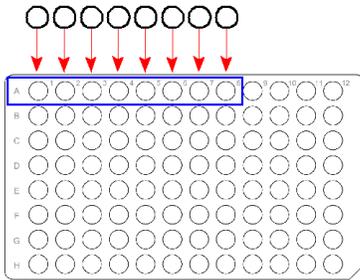
1. Añada lo siguiente al tubo Eppendorf de 1,5 ml («Dig.»):
 - NFW, enfriado ($2-8^{\circ}\text{C}$)
 - NSP I BUF
 - BSA

Mezcla maestra de digestión (28 muestras, 20 % de excedente)				
Reactivo	1 muestra	8 muestras	16 muestras	24 muestras
NFW	11,55 μl	110,9 μl	221,8 μl	332,6 μl
NSP I BUF	2,00 μl	19,2 μl	38,4 μl	57,6 μl
BSA	0,20 μl	1,9 μl	3,8 μl	5,8 μl
NSP I	1,00 μl	9,6 μl	19,2 μl	28,8 μl
Total	14,75 μl	141,6 μl	283,2 μl	424,8 μl

2. Mezcle en vórtex cada muestra tres veces durante un segundo.
3. Centrifugue rápido durante tres segundos.
4. Coloque la mezcla maestra de digestión en el bloque refrigerador enfriado ($2-8^{\circ}\text{C}$).
5. Saque la enzima NSP I del congelador y colóquela inmediatamente en el refrigerador enfriado (entre -25°C y -15°C).
6. Mezcle la NSP I.
 - a. Centrifugue rápido durante un segundo.
 - b. Mezcle en vórtex durante un segundo.
 - c. Centrifugue rápido durante tres segundos.
7. Vuelva a colocar en el refrigerador que está a una temperatura entre -25°C y -15°C mientras prepara la mezcla maestra de digestión.
8. Añada inmediatamente la NSP I a la mezcla maestra de digestión.
9. Vuelva a colocar la enzima en el refrigerador que está a una temperatura entre -25°C y -15°C .
10. Mezcle en vórtex cada mezcla maestra de digestión tres veces durante un segundo.
11. Centrifugue rápido durante tres segundos.
12. Coloque en el bloque refrigerador enfriado ($2-8^{\circ}\text{C}$).

D. Añadir la mezcla maestra de digestión a las muestras

1. Divida la mezcla maestra de digestión en partes iguales entre 8 o 12 tubos en tiras que están sobre el hielo.
2. Cierre el tubo en tiras con la tira de película adhesiva (o con tapas en tira).
3. Centrifúguela a $650 \times g$ durante un minuto y colóquela en el bloque refrigerador sobre hielo.
4. Retire y deseche el cierre.
5. Abra el cierre de la placa y deséchelo.
6. Utilice la pipeta multicanal P20 y añada 14,75 μl de la mezcla maestra de digestión a cada muestra en la fila A.



7. Cierre herméticamente la placa con un nuevo cierre.

E. Cargar las muestras en el termociclador

1. Mezcle en vórtex la placa durante un segundo, tanto las esquinas como en el centro.
2. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
3. Cargue la placa en el termociclador (*asegúrese de que la tapa del termociclador se haya precalentado*) y ejecute el programa **CytoScan Dx Digest**.
4. Deseche la mezcla maestra de digestión sobrante y vuelva a introducir los reactivos en el congelador.
5. Cuando haya acabado, deje la placa en el termociclador. Procésela en un periodo de 2,5 horas.
6. Asegúrese de que la placa está cerrada herméticamente y centrifúguela a 650 x g durante un minuto.
7. Coloque la placa en el bloque refrigerador sobre el hielo y proceda inmediatamente al paso 3. *Ligación*.

3. Ligación

Encienda el termociclador para precalentar la tapa. Deje el bloque a temperatura ambiente.

A. Establecer la zona de trabajo

1. Coloque el bloque refrigerador sobre el hielo.
2. Ponga la etiqueta «Lig.» en el tubo de 1,5 ml y colóquelo en el bloque refrigerador.
3. Coloque la tira de 8 tubos en la mitad superior del bloque refrigerador.
4. Corte la película adhesiva en tiras lo suficientemente anchas como para cerrar 8 o 12 tubos en tiras.

B. Descongelar los reactivos y las muestras digeridas

1. Deje que se descongelen a temperatura ambiente (≤ 30 minutos).
2. Colóquelos inmediatamente sobre el hielo y utilícelos en un periodo máximo de una hora.
 - NSP I ADAP
 - DNA LIG BUF

C. Preparar las muestras digeridas y los reactivos

1. Prepare las muestras:
 - a. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
 - b. Colóquelas en la mitad inferior del bloque refrigerador sobre el hielo.
2. Prepare los reactivos:
 - a. Mezcle en vórtex el DNA LIG BUF y el NSP I ADAP tres veces durante un segundo cada uno.

Nota: Mezcle en vórtex el tampón durante el tiempo que sea necesario antes de usarlo para asegurarse de que los sedimentos están resuspendidos y el tampón se ve transparente.
 - b. Centrifugue rápido durante tres segundos.
 - c. Coloque en el bloque refrigerador enfriado (2-8 °C).

D. Preparar la mezcla maestra de ligación

Prepare y almacene todos los reactivos, los tubos y el bloque refrigerador sobre el hielo. Sáquelo en un periodo de 10 minutos.

1. Ponga la etiqueta «Lig.» en el tubo de 1,5 ml y añada lo siguiente:
 - DNA LIG BUF
 - NSP I ADAP

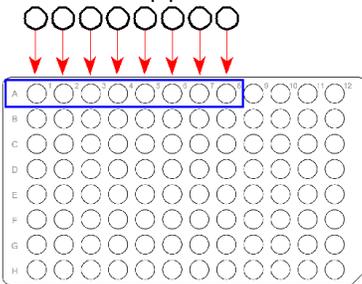
Mezcla maestra de ligación (≥8 muestras, 25 % de excedente)				
Reactivo	1 muestra	8 muestras	16 muestras	24 muestras
DNA LIG BUF	2,50 µl	25,0 µl	50,0 µl	75,0 µl
NSP I ADAP	0,75 µl	7,5 µl	15,0 µl	22,5 µl
DNA LIG	2,00 µl	20,0 µl	40,0 µl	60,0 µl
Total	5,25 µl	52,5 µl	105,0 µl	157,5 µl

2. Mezcle en vórtex cada muestra tres veces durante un segundo.
3. Centrifugue rápido durante tres segundos.
4. Saque el DNA LIG del congelador y colóquela inmediatamente en el refrigerador enfriado (entre -25 °C y -15 °C).

5. Mezcle el DNA LIG.
 - a. Centrifugue rápido durante un segundo.
 - b. Mezcle en vórtex durante un segundo.
 - c. Centrifugue rápido durante tres segundos.
6. Colóquelo en el refrigerador que está a una temperatura entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
7. Añada inmediatamente el DNA LIG a la mezcla maestra de ligación y, después, colóquela en el refrigerador que está a una temperatura entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
8. Mezcle en vórtex cada mezcla maestra de ligación tres veces durante un segundo.
9. Centrifugue rápido durante tres segundos.
10. Coloque la mezcla maestra de ligación en el bloque refrigerador sobre el hielo.
11. Proceda inmediatamente al siguiente paso.

E. Añadir la mezcla maestra de ligación

1. Divida la mezcla maestra de ligación en partes iguales entre 8 o 12 tubos en tiras que están sobre el hielo.
2. Cierre el tubo en tiras con la tira de película adhesiva (o con tapas en tira) y centrifúguela rápido.
3. Colóquelos de nuevo en el bloque refrigerador sobre el hielo.
4. Retire y deseche el cierre del tubo en tiras.
5. Abra el cierre de la placa de muestras digeridas y deséchelo.
6. Utilice la pipeta multicanal P20 y añada 5,25 μl de la mezcla maestra de ligación a cada muestra digerida.



F. Cargar las muestras en el termociclador

Asegúrese de que ha precalentado la tapa del termociclador.

1. Cierre herméticamente la placa con un nuevo cierre.
2. Mezcle las muestras en vórtex, tanto en las esquinas como en el centro.
3. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
4. Cargue la placa en el termociclador y ejecute el programa **CytoScan Dx Ligate**.
5. Deseche la mezcla maestra de ligación sobrante y vuelva a introducir los reactivos en el congelador.
6. Cuando haya acabado el programa, deje la placa en el termociclador.

Nota: Puede dejar la placa en el termociclador a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de 60 horas.
7. Después de quitarla del termociclador, asegúrese de que está cerrada herméticamente.
8. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
9. Consérvela a una temperatura entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nota: Este es el punto de detención óptimo. La placa se puede congelar a entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una semana como máximo.

4. PCR

Encienda el termociclador (sala posterior a la PCR) para precalentar la tapa.

A. Diluir las muestras ligadas

20 minutos antes de usarlo, coloque el NFW sobre el hielo.

1. Coloque el bloque refrigerador sobre el hielo.
2. Coloque el reservorio para reactivos en la mitad superior del bloque refrigerador sobre el hielo.
3. Vierta el NFW enfriado en el reservorio para reactivos.
4. Coloque la placa en la mitad inferior del bloque refrigerador sobre el hielo.

Nota: Si las muestras están congeladas, descongélas a temperatura ambiente (≤ 30 minutos). Centrifugue a 650 x g durante un minuto. Coloque de inmediato la placa en la mitad superior del bloque refrigerador. Procésela en un periodo de una hora.
5. Abra el cierre de la placa de muestras ligadas y deséchelo.
6. Con la pipeta P200, añada 75 μl de NFW a cada reacción.

ADN ligado	25 μl
NFW (enfriada)	75 μl
Total	100 μl

7. Cierre herméticamente la placa con un nuevo cierre.
8. Mezcle los tubos en vórtex durante un segundo, tanto en las esquinas como en el centro.
9. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
10. Vaya a *Run PCR* (Realizar PCR).

B. Realizar la PCR

B1. Transfiera a la placa para PCR.

1. Coloque el bloque refrigerador sobre el hielo.
2. Mantenga la placa de muestras diluida y ligada en la mitad superior del bloque refrigerador.
3. Añada la etiqueta «PCR» y colóquela en la mitad inferior del bloque refrigerador.
4. Abra el cierre de la placa de muestras ligadas y diluidas y deséchelo.
5. Utilice la pipeta multicanal P20 para transferir 10 µl de cada muestra al pocillo correspondiente de la placa para PCR (transfiera cuatro veces). Conserve las muestras restantes a una temperatura entre -25 °C y -15 °C.
6. Cierre herméticamente la placa con un nuevo cierre y centrifúguela a 650 x g durante un minuto.

B2. Descongelar los reactivos y las muestras

1. Descongele los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (≤30 minutos). Después, colóquelos inmediatamente sobre el hielo y utilícelos en un periodo máximo de una hora.
 - TAQ BUF
 - DNTPS
 - PCR PRIM

B3. Preparar los reactivos y las muestras ligadas

1. Añada la etiqueta «PCR» al tubo de centrifuga de 15 ml (*para >8 muestras*, use el tubo de 50 ml).
2. Colóquelo sobre el hielo.
 - NFW (enfriado en hielo durante 10 minutos)
 - GCM (si está congelado, descongélelo y mézclelo en vórtex hasta que esté completamente disuelto)
 - Reservorio para reactivos: en la mitad superior del bloque refrigerador sobre el hielo.
3. Coloque de inmediato la placa en la mitad inferior de la cámara.
4. Preparar los reactivos (no las enzimas):
 - a. Mezcle en vórtex cada reactivo tres veces durante tres segundos.
 - b. Centrifugue rápido durante tres segundos.
 - c. Coloque en el bloque refrigerador enfriado (2-8 °C).

C. Preparar la mezcla maestra para PCR

Prepare y almacene todos los reactivos, los tubos y el bloque refrigerador sobre el hielo. Dispénelos en un periodo de 20 minutos.

1. Mantenga el tubo de centrifuga de 15 ml sobre el hielo y añada los reactivos en el orden que se muestra aquí (excepto la TAQ ENZ; utilice el tubo cónico de 50 ml para la placa de 24 muestras).

Mezcla maestra para PCR (≥8 muestras, 15 % de excedente)				
Reactivo	1 reacción	8 muestras	16 muestras	24 muestras
NFW (enfriada)	39,5 µl	1.453,6 µl	2.907,2 µl	4.360,8 µl
TAQ BUF	10,0 µl	368,0 µl	736,0 µl	1.104,0 µl
GCM	20,0 µl	736,0 µl	1.472,0 µl	2.208,0 µl
DNTPS	14,0 µl	515,2 µl	1.030,4 µl	1.545,6 µl
PCR PRIM	4,5 µl	165,6 µl	331,2 µl	496,8 µl
TAQ ENZ*	2,0 µl	73,6 µl	147,2 µl	220,8 µl
Total	90,0 µl	3.312,0 µl	6.624,0 µl	9.936,0 µl

* No añadir hasta que se pueda añadir una alícuota de la mezcla maestra para PCR a las muestras ligadas.

2. Mezcle en vórtex durante tres segundos.
3. Saque la TAQ ENZ del congelador y colóquela inmediatamente en el refrigerador enfriado (entre -25 °C y -15 °C).
4. Mezcle la TAQ ENZ.
 - a. Centrifugue rápido durante un segundo.
 - b. Mezcle en vórtex durante un segundo.
 - c. Centrifugue rápido durante tres segundos.
5. Añádala de inmediato a la mezcla maestra para PCR. Después, devuélvala al refrigerador que está a una temperatura entre -25 °C y -15 °C.
6. Mezcle en vórtex cada mezcla maestra para PCR tres veces durante un segundo.
7. Vierta la mezcla maestra para PCR en el reservorio para reactivos. Mantenga el bloque refrigerador sobre el hielo.

D. Añadir la mezcla maestra para PCR a las muestras

1. Abra el cierre de la placa de muestras para PCR y deséchelo.
2. Utilice la pipeta multicanal P200 y añada 90 µl de la mezcla maestra para PCR a cada muestra de la placa para PCR.
 - Evite la contaminación: cambie las puntas de pipeta después de cada transferencia.
 - 8 muestras: incline el reservorio para reactivos de manera que cada punta de pipeta coja 90 µl.

ADN ligado y diluido	10 µl
Mezcla maestra para PCR	90 µl

Total	100 µl
-------	--------

3. Cierre herméticamente la placa con un nuevo cierre.
4. Mezcle las muestras en vórtex, tanto en las esquinas como en el centro.
5. Vuelva a mezclarlas en vórtex una vez.
6. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
7. Cargue de inmediato la placa en el termociclador.

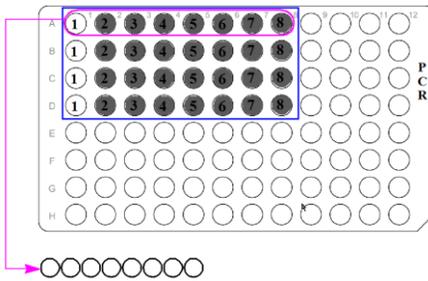
E. Cargar la placa y ejecutar el programa para PCR

Asegúrese de que ha precalentado la tapa del termociclador. Asegúrese de que el bloque está a temperatura ambiente (15-30 °C).

1. Mueva la placa que está sobre el hielo a la sala posterior a la PCR.
2. Cargue la placa en el termociclador.
3. Ejecute el programa para PCR CytoScan Dx
4. Cuando haya acabado, deje la placa en el termociclador.
Nota: Puede dejar la placa en el termociclador a 4 °C durante un máximo de 60 horas.
5. Tras sacarla del termociclador, manténgala en una gradilla para placas de 96 pocillos.
6. Asegúrese de que la placa está cerrada herméticamente.
7. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
8. Consérvela a una temperatura entre -25 °C y -15 °C.
Nota: Este es el punto de detención óptimo. La placa se puede congelar a entre -25 °C y -15 °C durante una semana como máximo.

F. Comprobar la reacción PCR

1. Abra el cierre de la placa para PCR y deséchelo.
2. Transfiera 3 µl de producto para PCR de cada pocillo de la fila A a los pocillos correspondientes del tubo en tiras. (para >12 muestras, transfiera 3 µl de producto para PCR de la primera fila por cada cuatro filas de las mismas muestras).



Error! Reference source not found.

3. Cierre herméticamente la placa para PCR con un nuevo cierre.
4. Cierre los tubos en tiras de gel con la tira de película adhesiva.
5. Mezcle en vórtex los tubos en tiras de gel.
6. Centrifúguela en la microcentrífuga.
7. Introduzca las muestras en gel de agarosa al 2 % para que se suelten las bandas (consulte el apartado 11. Control de calidad).
8. Compruebe que el producto para PCR está distribuido en las bandas 150-2.000 pb.
Importante: El producto de PCR debe estar en el rango para proceder.

5. Purificación del producto de PCR

A. Preparar el tampón de lavado de purificación

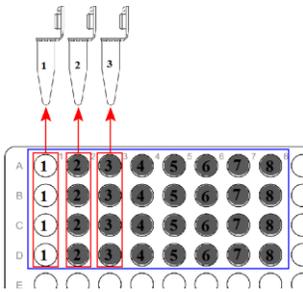
1. Añada 45 ml de etanol absoluto a la botella PW BUF.
2. Cierre la botella herméticamente y mezcle el contenido invirtiendo la botella de PW BUF cerrada 10 veces.
3. Escriba en la etiqueta de la botella la fecha en la que ha añadido el etanol.

B. Preparar productos de PCR

B1. Mezclar los productos de PCR

Es necesario transferir el producto intermedio del ensayo de la placa a los tubos independientes. Haga la transferencia a temperatura ambiente.

1. Con un rotulador permanente, marque cada tubo de 1,5 ml con el número de la muestra.
2. Asegúrese de que la placa está cerrada herméticamente.
3. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
4. Retire y deseche el cierre de la placa.
5. Con la pipeta P200, transfiera las cuatro alícuotas de cada muestra al tubo marcado de 1,5 ml.



Nota: Si utiliza una pipeta multicanal P200, alinee las puntas para asegurarse de que se realice el pipeteado multicanal a los pocillos de la placa y los tubos con coincidencia de tubo/placa y pipeta.

Importante: Evite la contaminación cruzada. Utilice una pipeta nueva para cada transferencia y tenga cuidado con las puntas de las pipetas cuando extraiga las muestras para la purificación.

6. **Asegúrese de que transfiera y extrae el volumen total a cada pocillo.**

Pocillos para PCR (4)	100 µl en cada pocillo	= 400 µl
Volumen total en cada tubo de 1,5 ml		= 400 µl/tubo – 3 ml de alícuota para el gel para PCR

B2. Purificar los productos de PCR

Cambie las puntas después de cada pipeteado.

- Mezcle bien la solución madre de PURIF BDS. Invierta la botella 10 veces. Examine el fondo de la botella para asegurarse de que la solución queda homogénea.
- Abra con cuidado las tapas de los tubos para evitar que se derrame el contenido.
- Añada el PURIF BDS a cada muestra mezclada:
 - 8 muestras: Utilice una pipeta monocanal P1000 y añada 720 µl de PURIF BDS directamente de la botella.
 - 16 y 24 muestras: Utilice una pipeta multicanal P1000 y añada 720 µl de PURIF BDS. Añada el PURIF BDS con la pipeta multicanal P1000.
 - 16 muestras: añada **15 ml** de PURIF BDS al reservorio para reactivos.
 - 24 muestras: añada **21 ml** de PURIF BDS al reservorio para reactivos.
- Añada **720 µl** de PURIF BDS a cada muestra extraída (a tres o cuatro muestras a la vez). Alinee las puntas para permitir el pipeteado multicanal a los tubos con coincidencia de tubo y pipeta.
- Cierre herméticamente cada tubo e inviértalo 10 veces.
- Incúbelos a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Cargue los tubos en la microcentrifuga con la bisagra de la tapa hacia afuera y centrifúgelos a 16.000 x g durante tres minutos.
- Coloque los tubos en el soporte magnético de forma que la bisagra de la tapa quede por encima del imán. Asegúrese de que el pellet avanza completamente hacia el imán.
- Utilice una pipeta P1000 para retirar el sobrenadante sin tocar el pellet de microesferas. Deseche el sobrenadante.
 - 16 y 24 muestras: Utilice una pipeta multicanal P1000. Retire el sobrenadante de 3-4 muestras al mismo tiempo.

B3. Añadir el tampón de lavado de purificación

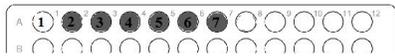
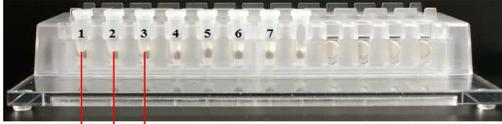
- Con la pipeta P1000, añada 1 µl de PW BUF a cada tubo.
 - 16 y 24 muestras: Vierta el PW BUF al depósito. Con la pipeta multicanal, añada **1 ml** de PW BUF a cada tubo (3-4 muestras al mismo tiempo).
- Cierre los tubos y cárguelos en el adaptador de espuma para tubos. Introduzca por completo los tubos en la pieza de espuma de forma segura. Separe uniformemente los tubos con las muestras. Compénselos si es necesario.
- Mézclelos en vórtex durante dos minutos.

Nota: Es posible que el pellet de microesferas no se resuspenda por completo, y es aceptable.
- Centrifugue los tubos, con la bisagra de la tapa hacia afuera, a 16.000 x g durante tres minutos.
- Coloque los tubos en el soporte magnético hasta que todos los pellets se muevan hacia el imán.
- Utilice una pipeta P1000 para retirar el sobrenadante sin tocar el pellet de microesferas y deseche el sobrenadante.
 - 16 y 24 muestras: Con la pipeta multicanal, retire el sobrenadante de 3-4 muestras al mismo tiempo.
- Centrifugue los tubos, con las bisagras de las tapas hacia afuera, a 16.000 x g durante 30 segundos; luego, coloque los tubos nuevamente sobre el soporte magnético de modo que la bisagra de la tapa se encuentre sobre el imán. Asegúrese de que el pellet avanza completamente hacia el imán.
- Con la pipeta P20, retire las gotas restantes de PW BUF del fondo de cada tubo (una muestra a la vez). No toque ni rompa el pellet de microesferas.
- Quite los tubos del soporte magnético y deje que el PW BUF restante se evapore dejando los tubos abiertos a temperatura ambiente durante 10 minutos.

B4. Añadir el tampón de elución

- Con la pipeta P100, añada 52 µl de ELU BUF directamente sobre las microesferas que hay en cada tubo.
 - 16 y 24 muestras: Utilice una pipeta multicanal P200. Añada tres o cuatro muestras al mismo tiempo.
- Cierre los tubos y cárguelos en el adaptador de espuma para tubos. Compense los tubos.
- Mézclelos en vórtex durante 10 minutos para resuspender las microesferas.

4. Examine cada tubo para asegurarse de que las microesferas están resuspendidas en una mezcla homogénea. (Si las microesferas no se han resuspendido por completo, golpee suavemente el tubo con el dedo para desprender el pellet y mézclelo en vórtex durante dos minutos; vuelva a examinar los tubos, desprenda el pellet y mézclelo en vórtex hasta que se resuspendan las microesferas).
 5. Centrifugue los tubos, con la bisagra de la tapa hacia afuera, a 16.000 x g durante tres minutos.
 6. Coloque los tubos en el soporte magnético durante 10 minutos, de forma que las microesferas se muevan al lateral del tubo.
 7. Transfiera 47 µl de muestra eluida al pocillo adecuado en la nueva placa de 96 pocillos, tal como se muestra.
- Importante:** Asegúrese de que se pipetea el volumen correcto. El paso de fragmentación es sensible a la masa de entrada.



Nota: Es posible que la elución tenga un aspecto amarronado. A veces, se puede apreciar un residuo marrón en la punta de la pipeta, pero suele quedarse en la punta cuando se vierte la muestra.

8. Cierre herméticamente la placa y mezcle en vórtex durante un segundo, en todas las esquinas y en el centro.
9. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
10. Asegúrese de que la placa está cerrada herméticamente.
11. Proceda al paso 6. *Cuantificación.*

6. Cuantificación

Este ensayo se ha optimizado utilizando un espectrofotómetro UV para la cuantificación. Es esencial la precisión en la medida de DO. Asegúrese de que la medida de DO está dentro del rango lineal del instrumento.

A. Preparar los reactivos, el equipo y el material fungible

Encienda el espectrofotómetro como mínimo 10 minutos antes de usarlo.

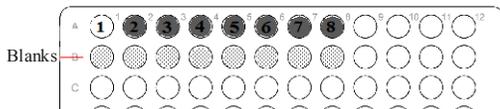
Coloque sobre la mesa:

- NFW
- Placa de UV o placa de 96 pocillos
- Opcional: tubo cónico o reservorio para reactivos

B. Espectrofotómetro en microplaca

B1. Preparar las alícuotas diluidas de las muestras purificadas

1. Utilice una pipeta multicanal P200 para añadir 198 µl de NFW a los pocillos para muestras de la placa de UV.
2. Blanco: añada 200 µl de NFW a cada pocillo de la fila vacía.



3. Utilice una pipeta multicanal P20 para:
 - a. Transferir 2 µl de cada muestra purificada al pocillo correspondiente de la placa de UV.
 - b. Pipetear hacia arriba y hacia abajo dos veces para extraer toda la muestra (dilución 1/100).
4. Utilice un cierre nuevo, cierre la placa herméticamente y consérvela a una temperatura entre -25 °C y -15 °C.

Importante: Debe retirar la placa dentro de un periodo máximo de 20 horas.

5. Cierre la placa de UV y utilice un paño de laboratorio sin pelusas en la superficie del adaptador.
6. Mezcle en vórtex y centrifugue a 650 x g durante un minuto.

B2. Cuantificar el producto para PCR diluido y purificado

Nota: una unidad de absorbancia a 260 nm = 50 µg/dl (equivalente a 0,05 µg/dl) para productos de PCR bicatenados (para la longitud del trayecto = 1 cm).

1. Mida la DO de cada muestra a 260, 280 y 320 nm. Utilice DO280 y DO320 como controles.
2. Determine la medida de DO260 para el blanco de agua y calcule la media.
3. Determine la concentración de cada producto de PCR:
 - a. Calcule una lectura de DO para cada muestra: $DO = (DO \text{ de la muestra}) - (DO \text{ media del blanco de agua})$
 - b. Calcule la concentración sin diluir de cada muestra en µg/dl: $DO \times 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 100$
4. Determine un rendimiento de ADN aceptable.

Nota: Para cada muestra, el rendimiento del ADN debe ser $\geq 2,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. El rendimiento de ADN medio para ocho o más muestras debe ser $\geq 3,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. *No siga procesando muestras que no cumplen este requisito.*

Estos rangos de DO se basan en el uso de las lecturas convencionales del espectrofotómetro UV y asumen que la longitud del trayecto = 1 cm.

- Relación de DO260/DO280 = 1,7-2,1.

No proceda si el valor no entra en este rango.

- Medida de DO320 muy cercana a cero ($\leq 0,1$).
5. Proceda inmediatamente al paso 7 *Fragmentación* o conserve la placa entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 horas.

7. Fragmentación

Realice todas las adiciones, diluciones y mezclas sobre hielo. Asegúrese de que todos los reactivos alcanzan el equilibrio antes de usarlos.

A. Precauciones

- La enzima es sensible a la temperatura:
 - Coja el tubo *solo* por el tapón o la base. No toque el tubo por los lados.
 - Manténgalo a una temperatura entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ cuando aspire el volumen enzimático.
 - Centrifúguelo para que su contenido quede uniforme.
 - Realice todos los pasos rápidamente y sin interrupción.
- Añada la enzima a la mezcla maestra de fragmentación en último lugar.
- La enzima es viscosa:
 - Pipetee despacio.
 - Evite el exceso de solución por fuera de la punta de la pipeta.

B. Preparación

Encienda el termociclador para precalentar la tapa. Deje el bloque a temperatura ambiente.

B1. Establecer la zona de trabajo

1. Configure la centrifuga de placas entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 15-20 minutos antes del paso de fragmentación y cierre la tapa.
2. Coloque el bloque refrigerador y el NFW en hielo.
3. Coloque la tira de 8 tubos en el bloque refrigerador enfriado ($2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$) como mínimo 10 minutos antes de usarlo.
4. Ponga la etiqueta «FRAG.» al tubo Eppendorf de 1,5 ml y manténgalo frío en el bloque refrigerador.
5. Corte la película adhesiva en tiras lo suficientemente anchas como para cerrar 8 o 12 tubos en tiras.

B2. Descongelar y preparar reactivos

1. Descongele la placa de las muestras purificadas y cuantificadas a temperatura ambiente (≤ 30 minutos).
2. Asegúrese de que está cerrada herméticamente y centrifúguela a $650 \times g$ durante un minuto.
3. Coloque la placa en la mitad inferior del bloque refrigerador durante al menos 10 minutos. Procésela en un periodo de una hora.
4. Descongele el FRAG BUF a temperatura ambiente (≤ 30 minutos) y colóquelo en el bloque refrigerador sobre el hielo.

Importante: Utilícelo en un periodo de una hora.

5. Prepare el FRAG BUFF:
 - a. Mezcle en vórtex cada muestra tres veces durante un segundo.
 - b. Centrifugue rápido durante tres segundos.
 - c. Coloque en el bloque refrigerador enfriado ($2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$).

B3. Prepare la muestra maestra de fragmentación

Prepare y almacene todos los reactivos, los tubos y el bloque refrigerador sobre el hielo. Sáquelo en un periodo de 10 minutos. Prepare siempre la mezcla maestra de fragmentación de acuerdo con la tabla del Paso 1b, independientemente del número de muestras.

1. Añada el NFW y FRAG BUF de acuerdo con la siguiente tabla.
 - a. Mezcle en vórtex el tubo tres veces durante un segundo.
 - b. Centrifugue rápido durante tres segundos.

Mezcla maestra de fragmentación	
NFW	271,2 μl
FRAG BUF	343,8 μl
FRAG RGT	10,0 μl
Total	625,0 μl

2. Saque el FRAG RGT del congelador y colóquelo de inmediato en el refrigerador enfriado entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - a. Centrifúguelo rápido durante un segundo.
 - b. Mezcle en vórtex durante un segundo.
 - c. Centrifugue rápido durante tres segundos.
 - d. Colóquelo de inmediato en el refrigerador que está a una temperatura entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Añada el reactivo de fragmentación de acuerdo con la tabla del Paso 2.
4. Vuelva a colocarlo de inmediato en el refrigerador que está a una temperatura entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
5. Mezcle en vórtex cada mezcla maestra de fragmentación tres veces durante un segundo.
6. Centrifugue rápido durante tres segundos y vuelva a colocarlas inmediatamente en el bloque refrigerador.

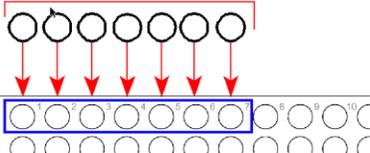
C. Fragmentación

C1. Añadir la mezcla maestra de fragmentación a las muestras

1. Añada rápidamente **78 µl** de mezcla maestra de fragmentación a cada pocillo de los tubos en tiras que se encuentran en el bloque refrigerador sobre el hielo.
2. Cierre los tubos en tiras con la tira de película adhesiva o con tapas en tira.
3. Centrifugue los tubos en tiras y colóquelos de nuevo en el bloque refrigerador sobre el hielo.
4. Retire y deseche el cierre de la placa.
5. Utilice una pipeta multicanal P20 para transferir 10 µl de la mezcla maestra de fragmentación a cada muestra, tal como se muestra en la tabla.

Producto de PCR purificado	45 µl
Mezcla maestra de fragmentación	10 µl
Total	55 µl

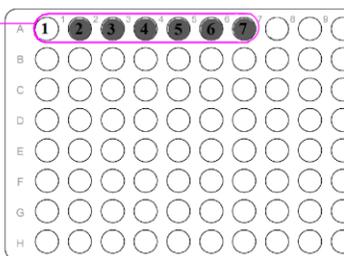
No pipetee hacia arriba y hacia abajo. No introduzca burbujas de aire en el fondo de los tubos.



6. Cierre herméticamente la placa con un nuevo cierre.
7. Mezcle los tubos en vórtex durante un segundo, tanto en las esquinas como en el centro.
8. Lleve a centrifugar la placa de muestras al bloque refrigerador que se encuentra sobre la caja de hielo (2-8 °C).
9. Centrifugue en una centrifuga preenfriada a 650 x g durante un minuto. Retire rápidamente la placa de la centrifuga y colóquela en el bloque refrigerador en la caja de hielo.
10. Lleve la placa de muestras al bloque refrigerador en la caja de hielo y cargue inmediatamente la placa de fragmentación en el termociclador con la tapa precalentada.
11. Ejecute el programa **CytoScan Dx Fragment**.
12. Cuando haya acabado, deje la placa en el termociclador. Procésela en un periodo de 2,5 horas.
13. Tras sacarla del termociclador, asegúrese de que la placa está cerrada herméticamente y centrifúguela a 650 x g durante un minuto. Después, transfírela al bloque refrigerador enfriado sobre el hielo.
14. Retire y deseche cualquier resto de la mezcla maestra de fragmentación. *No vuelva a usar la mezcla maestra de fragmentación.*

C2. Comprobar la reacción de fragmentación

1. Realice la prueba en gel de agarosa al 4 % para comprobar la fragmentación.
2. Asegúrese de que la placa está cerrada herméticamente y centrifugue a 650 x g durante un minuto. Colóquela en la mitad inferior del bloque refrigerador sobre el hielo.
3. Ponga la etiqueta «Dil.» al tubo en tiras de 8 tubos.
4. Añada **28 µl** de agua sin nucleasas a cada pocillo del tubo en tiras.
5. Abra la placa de ADN fragmentado y deseche el cierre.
6. Añada **4 µl** de las muestras fragmentadas que hay en la placa a los pocillos correspondientes del tubo en tiras con la etiqueta «Dil.».



7. Cierre la placa de ADN fragmentado con un cierre nuevo y consérvela en la mitad inferior del bloque refrigerador sobre el hielo.
8. Ponga la etiqueta «Análisis gel» a los tubos en tiras con 8 o 12 pocillos.
9. Introduzca las muestras en gel de agarosa al 4 % para que se suelten las bandas.
10. Inspeccione el gel y proceda al paso 11. *Control de calidad durante el proceso.* La distribución de las bandas debe ser de **25-125 pb**.

8. Marcaje

A. Preparación

Encienda el termociclador para precalentar la tapa. Deje el bloque a temperatura ambiente.

A1. Establecer la zona de trabajo

1. Coloque el bloque refrigerador sobre el hielo.
2. Coloque la tira de 8 tubos en la mitad superior del bloque refrigerador sobre el hielo.
3. Ponga la etiqueta «ETIQ.» en el tubo de microcentrifuga 1,5 ml y colóquelo en el bloque refrigerador.
4. Corte la película adhesiva en tiras lo suficientemente anchas como para cerrar 8 o 12 tubos en tiras.

A2. Descongelar y preparar reactivos

1. Descongele los tubos a temperatura ambiente (≤30 minutos) y colóquelos de inmediato en hielo. Utilícelos en un periodo máximo de una hora:
 - TDT BUF
 - DNA LBEL RGT
2. Prepare el TDT BUF y el DNA LBEL RGT:
 - a. Mezcle en vórtex cada muestra tres veces durante un segundo.
 - b. Centrifúguelas rápido durante tres segundos y vuelva a colocarlas en el bloque refrigerador.

A3. Preparar la mezcla maestra de marcaje

Prepare y almacene todos los reactivos, los tubos y el bloque refrigerador sobre el hielo. Sáquelo en un periodo de 10 minutos.

1. Añádalos al tubo de 1,5 ml que está en hielo en este orden:

TDT BUF
DNA LBEL RGT

Marcaje (≥8 muestras, 20 % de excedente)				
Reactivo	1 muestra	8 muestras	16 muestras	24 muestras
TDT BUF	14,0 µl	134,4 µl	268,8 µl	403,2 µl
DNA LBEL RGT	2,0 µl	19,2 µl	38,4 µl	57,6 µl
TDT ENZ	3,5 µl	33,6 µl	67,2 µl	100,8 µl
Total	19,5 µl	187,2 µl	374,4 µl	561,6 µl

2. Coloque la TDT ENZ en el refrigerador preenfriado entre -25 °C y -15 °C.
3. Mézclelo.
 - a. Centrifugue rápido durante un segundo.
 - b. Mezcle en vórtex cada muestra tres veces durante un segundo.
 - c. Centrifúguelas rápido durante tres segundos y vuelva a colocarlas en el bloque refrigerador.
4. Colóquelo de inmediato en el refrigerador que está a una temperatura entre -25 °C y -15 °C.
5. Añada el TDT ENZ a la mezcla maestra de marcaje. Colóquelo en el refrigerador que está a una temperatura entre -25 °C y -15 °C.
6. Mezcle en vórtex cada mezcla maestra de marcaje tres veces durante un segundo.
7. Centrifugue rápido durante tres segundos.

B. Marcaje

B1. Añadir la mezcla maestra de marcaje

Deje las muestras en el bloque refrigerador y todos los tubos sobre el hielo cuando haga adiciones.

1. Añada la mezcla maestra de marcaje a los tubos en tiras preenfriados que están en el bloque refrigerador sobre el hielo.
2. Cierre la tira con la tira de película adhesiva (o con tapas en tira) y centrifúguela rápido.
3. Colóquela de nuevo en el bloque refrigerador.
4. Retire y deseche el cierre de la placa.
5. Utilice una pipeta multicanal P20 para añadir **19,5 µl** de la mezcla maestra de marcaje a cada muestra.

ADN fragmentado (menos de 4 µl para el análisis de gel)	51,0 µl
Mezcla maestra de marcaje	19,5 µl
Total	70,5 µl

6. Utilice un cierre nuevo y cierre herméticamente la placa.
7. Mezcle en vórtex durante un segundo, tanto las esquinas como en el centro.
8. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
9. Coloque la placa de marcaje en el termociclador y ejecute el programa **CytoScan Dx Label**.
10. Cuando haya acabado el programa, deje la placa en el termociclador o transfírela al bloque refrigerador sobre el hielo.
11. Asegúrese de que la placa está cerrada herméticamente y centrifúguela a 650 x g durante un minuto.

Nota: Puede dejar la placa en el termociclador a 4 °C durante un máximo de 60 horas.

9. Mezcla de hibridación

A. Preparación

1. Inicie sesión en AMDS.
2. Encienda el termociclador para precalentar la tapa. Deje el bloque a temperatura ambiente.

3. Por lo menos *una hora antes* de la hibridación, encienda el horno a 50 °C y establezca las rpm a 60.

Nota: Retire el array del almacenamiento una hora antes de la hibridación para que ajuste a la temperatura ambiente. *No retire los arrays de la bolsa.*

B. Crear una solicitud de prueba (Test request) y registrar el array

1. Panel izquierdo del flujo de trabajo: seleccione **Active Worklist** (Lista de trabajo activa).
2. En la barra de herramientas, haga clic en **Create** (Crear).
3. Utilice un lector de códigos de barras inalámbrico para introducir el código de barras del **ID de la muestra**.
4. Vaya a la lista desplegable **Assay Name** (Nombre del ensayo) y seleccione **CytoScanDx**.
Nota: Los ID de las muestras no tienen que ser únicos y pueden contener 40 caracteres.
Importante: Asegúrese de que no hay duplicaciones accidentales de los ID de las muestras.
5. Introduzca las combinaciones de **ID de la muestra** y **Nombre del ensayo** para cada microarray.
Nota: Si el ID de la muestra no tiene un código de barras, introduzca manualmente el ID de la muestra. Para introducir la información manualmente, seleccione un campo Specimen ID (ID de la muestra) en una solicitud de prueba (test request), introduzca el valor y haga clic en **Enter** (Introducir).
6. En la barra de herramientas, haga clic en **Submit** (Enviar).

C. Registrar los microarrays

1. Desenvuelva los arrays y colóquelos en una superficie limpia y sin pelusas a temperatura ambiente como máximo 30 minutos antes de la hibridación.
2. Etiquete cada array con una designación que identifique la muestra que va en él.
3. Panel izquierdo del flujo de trabajo: seleccione **Registration** (Registro).
4. Utilice un escáner de códigos de barras inalámbrico para escanear el código de barras del ID de la muestra.
Nota: Si se utiliza varias veces el mismo ID de la muestra, el sistema le pide que seleccione el que es correcto para asociarlo con el cartucho del array correspondiente. Siga las instrucciones que aparecen en la pantalla de AMDS.
5. Escanee el código de barras de array del cartucho correspondiente del array.
Nota: Si el ID de la muestra no tiene un código de barras, seleccione manualmente la fila asociada al ID de la muestra. Después, escanee el código de barras del cartucho correspondiente del array. Si quiere completar el registro más tarde, vaya a la barra de herramientas Registration Worklist (Lista de trabajo del registro) y haga clic en **Save** (Guardar).
Si quiere hacer el seguimiento de los reactivos y tampones de lavado que ha utilizado, haga clic en el campo **Assay Name** (Nombre del ensayo). En la pantalla de inicio del ensayo, seleccione las solicitudes de prueba (test requests) actuales y, después, escanee los códigos de barras de los kits de los reactivos y de las botellas de los tampones de lavado. Los números de lote y las fechas de caducidad se asociarán a las solicitudes de prueba (test requests).
6. En la barra de herramientas Registration Worklist (Lista de trabajo del registro), haga clic en **Complete Step** (Completar paso).

D. Preparar los arrays

Utilice un paño no abrasivo y sin pelusas para limpiar la superficie de cristal de los arrays antes de escanearlos.

1. Coloque los arrays en una zona limpia a temperatura ambiente.
2. Limpie cualquier exceso de fluido que haya alrededor de las membranas de goma de la parte trasera del array.
3. Inserte la punta de la pipeta de 200 µl en la membrana de goma superior derecha de cada array.
4. Pegue dos etiquetas redondas adhesivas de 12,7 mm a la esquina superior del array, tal como se muestra.



E. Preparar para la hibridación

E1. Establecer la zona de trabajo

1. Coloque el bloque refrigerador sobre el hielo.
2. Coloque el reservorio para reactivos en la mitad superior del bloque refrigerador sobre el hielo.
3. Añada la etiqueta «Mez. maes. hib.» al tubo de centrifuga de 15 ml y colóquelo en el hielo.

E2. Preparar las muestras y los reactivos

Prepare y almacene todos los reactivos, los tubos y el bloque refrigerador sobre el hielo. Sáquelo en un periodo de 10 minutos.

1. Coloque la placa en la mitad inferior del bloque refrigerador sobre el hielo.
2. Descongélelos a temperatura ambiente (≤30 minutos), colóquelos inmediatamente sobre el hielo y úselos en un periodo máximo de una hora:
 - HYB BUF 1
 - HYB BUF 2

- HYB BUF 3
 - HYB BUF 4
 - OCR
3. Mezcle en vórtex cada reactivo tres veces durante un segundo.
 4. Centrifugue rápido durante tres segundos y vuelva a colocarlo en el bloque refrigerador.

E3. Preparar la mezcla maestra de hibridación

1. Añada cada reactivo en el siguiente orden a cada tubo de Hyb Master Mix de **15 ml** que está en el hielo.

Mezcla maestra de hibridación (≥8 muestras, 20 % de excedente)				
Reactivo	1 muestra	8 muestras	16 muestras	24 muestras
HYB BUF 1	165,0 µl	1.584 µl	3.168,0 µl	4.752 µl
HYB BUF 2	15,0 µl	144,0 µl	288,0 µl	432,0 µl
HYB BUF 3	7,0 µl	67,2 µl	134,4 µl	201,6 µl
HYB BUF 4	1,0 µl	9,6 µl	19,2 µl	28,8 µl
OCR	2,0 µl	19,2 µl	38,4 µl	57,6 µl
Total	190 µl	1.824 µl	3.648 µl	5.472 µl

2. Mezcle en vórtex cada muestra tres veces durante un segundo (hasta que queden homogéneas).
3. Centrifugue rápido durante tres segundos.

Nota: Cualquier precipitación en la mezcla maestra de hibridación (después de que se haya mezclado) se disuelve durante la hibridación a 50 °C.

E4. Añadir la mezcla maestra de hibridación y desnaturalizar las muestras

1. Retire y deseche el cierre de la placa.
2. Vierta la mezcla maestra de hibridación en el reservorio para reactivos situado en la mitad superior de la cámara refrigeradora sobre el hielo.
3. Utilice una pipeta multicanal para añadir **190 µl** de la mezcla de hibridación a las muestras.
4. Utilice un cierre nuevo y cierre herméticamente la placa.
5. Mezcle en vórtex durante un segundo, tanto las esquinas como en el centro.
6. Vuelva a mezclarlas en vórtex.
7. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.

Nota: Este **punto de detención es opcional**; cierre la placa herméticamente y consérvela con las muestras en la mezcla maestra de hibridación a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C durante una semana como máximo. Para usarlas:

- a. Deje que se descongelen a temperatura ambiente.
- b. Asegúrese de que la placa está cerrada herméticamente.
- c. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
- d. Retire el cierre y sustitúyalo por uno nuevo.
- e. Cíerrela herméticamente.
- f. Mezcle en vórtex para garantizar que se mezcle del todo.
- g. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
- h. Coloque la placa en el bloque refrigerador sobre el hielo.
8. Coloque la placa en el termociclador y ejecute el programa **CytoScan Dx Hyb**.

F. Hibridación en arrays

F1. Cargar muestras en arrays

1. Cuando el termociclador alcance una temperatura de **49 °C constantes**, (∞), abra la tapa y cargue las muestras en los arrays de inmediato.
 - >8 *muestras*: Hibride 4 muestras a la vez (corte el cierre de la placa y retírelas fila a fila), pero mantenga los pocillos restantes cubiertos.
- Importante:** La mezcla de hibridación es viscosa. Pipeteo despacio para obtener una mayor precisión.
2. Con la pipeta P200, retire **200 µl** de la primera muestra e inyéctelos inmediatamente en el array. Cargue todas las muestras en un periodo de 30 minutos.
3. Tape las membranas de goma del array con etiquetas redondas adhesivas de 12,7 mm desde el borde superior del array y presione firmemente como se indica en la imagen.



4. Cuando todos los arrays están cargados y las membranas de goma tapadas:
 - a. Cargue los arrays y distribúylos uniformemente en la bandeja del horno.
 - b. Introduzca inmediatamente la bandeja en el horno de hibridación.

Importante: No permita que los arrays cargados permanezcan a temperatura ambiente durante más de 1 minuto. Asegúrese de que el horno esté equilibrado mientras carga las bandejas y que estas bandejas giran siempre a 60 rpm.

5. En la lista de trabajo, haga clic en **Hybridization Oven** (Horno de hibridación).
6. Asocie las solicitudes de prueba (test requests) con el horno:
 - a. Seleccione todas las solicitudes de prueba (Test requests) para arrays en el horno: Seleccione todas las solicitudes de prueba (Test requests) para una bandeja en concreto seleccionando una solicitud de prueba (Test request) y haciendo clic en **Select Tray** (Seleccionar bandeja).

Nota: No puede cambiar ningún parámetro en el campo Time/Rotation/Duration (Tiempo/Rotación/Duración) que se muestra en Hybridization Oven Worklist (Lista de trabajo Horno de hibridación).
 - b. Mantenga pulsada la tecla **Ctrl**.
 - c. Coloque el cursor en el campo de número del horno seleccionado.
 - d. Suelte la tecla **Ctrl**.
 - e. Introduzca el número de horno.
 - o Si el horno está conectado a la estación de trabajo, el valor es «1» o «2» dependiendo de la configuración o bien
 - o Si el horno no está conectado a la estación de trabajo, introduzca «E» para el campo externo en el campo Oven # (N.º de horno).
 - f. Pulse **Intro**.
7. Seleccione una o más solicitudes de prueba (Test requests).

Nota: Todas las solicitudes de prueba (Test requests) que se ejecutan a la vez en el mismo horno deben tener la misma temperatura, rotación y duración requeridas.
8. En la barra de herramientas Hybridization Oven Worklist (Lista de trabajo Horno de hibridación), haga clic en **Start** (Comenzar).

Nota: Si el horno está conectado, AMDS muestra constantemente su estado en el panel Device Status (Estado del dispositivo), en el lado derecho de la lista de trabajo.
9. Repita esta acción hasta que todas las muestras estén cargadas en arrays colóquelas en el horno de hibridación. Cargue todas las muestras en un periodo de 30 minutos.
10. Configure los arrays para que roten a 50 °C y 60 rpm durante 16-18 horas.
11. Deseche el objetivo de hibridación sobrante.

10. Lavar, teñir y escanear arrays

A. Cebiar la estación de fluidos

Realice el cebado siempre en las condiciones siguientes:

- Antes de procesar cartuchos
- Después del inicio
- Después de cambiar la solución de lavado

A1. Cebiar la estación de fluidos

1. Seleccione el número de estación que desea cebiar.
2. Añada WS A y WS B a la estación de fluidos.

Importante: Asegúrese de que los tampones de lavado estén colocados correctamente y que las líneas de lavado adecuadas estén en los tampones respectivos.
3. Coloque 3 tubos vacíos de 1,5 ml en los soportes de las muestras del módulo para cebarlos.
4. En el panel izquierdo del flujo de trabajo Active Worklist (Lista de trabajo activa):
 - g. Haga clic en **Fluidics** (Fluidos).
 - h. Haga clic en **Station Setup** (Configuración de estación).
5. En la lista desplegable de Ensayos, seleccione **CytoScanDx Assay** (Ensayo CytoScanDx).
6. Destaque las estaciones que desea cebiar y seleccione los 4 módulos.
7. Haga clic en **Prime Station** (Cebiar estación).
8. Introduzca una **firma electrónica**.
9. Siga las instrucciones de la ventana LCD Fluidics Station (Estación de fluidos).
10. En la barra de herramientas Fluidics Worklist (Lista de trabajo de fluidos), haga clic en **Close Setup Screen** (Cerrar pantalla de configuración).

B. Lavar y teñir arrays

B1. Configuración

1. Mezcle en vórtex la tinción y las botellas AH BUF antes de añadir reactivos.
2. Añádalos a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml para cada array:
 - a. Tubos ámbar: **500 µl** SB 1; *el SB 1 es sensible a la luz.*
 - b. Tubos transparentes/naturales: **500 µl** SB 2.
 - c. Tubos azules: **800 µl** AH BUF.
3. En la barra de herramientas Hybridization Oven Worklist (Lista de trabajo Horno de hibridación), seleccione las solicitudes de prueba (test requests).
4. Haga clic en **End** (Finalizar).

5. Haga clic en **Complete Step** (Completar paso).
6. Cuando haya terminado, retire los microarrays.
Importante: Retire *solamente 4 arrays a la vez* del horno y transfiera todos los arrays del horno de hibridación a las estaciones de fluidos en un periodo de 20 minutos.
7. Retire las etiquetas redondas adhesivas de 12,7 mm de los arrays.

B2. Lavar y teñir

1. En el panel izquierdo del flujo de trabajo, seleccione **Fluidics** (Fluidos).
2. Coloque los microarrays:
 - a. Mantenga la palanca del cartucho en la posición inferior (expulsar).
 - b. Coloque el microarray en el módulo correcto de la estación de fluidos.
 - c. Vuelva a colocar la palanca del cartucho en la posición superior (conectada).
3. Escanee los microarrays:
 - a. Escanee cada microarray con el lector de código de barras inalámbrico.
 - b. Escanee inmediatamente el módulo de estación de fluidos para cada microarray.
Nota: El código de barras de array en el microarray identifica la solicitud de prueba (Test request) adecuada registrada en esa ID de array.
4. Cuando el estado sea **Ready** (Listo), seleccione las solicitudes de prueba (Test requests) en AMDS.
5. En la barra de herramientas del panel Fluidics Worklist (Lista de trabajo de fluidos), haga clic en **Start** (Comenzar).
6. Siga las instrucciones y compruebe el estado en la ventana LCD Fluidics Station (Estación de fluidos).
7. Cuando finalice, presione la palanca del cartucho hacia abajo (expulsar).
8. Retire el array y revise la ventana del array en busca de burbujas o bolsas de aire.
Si todavía hay burbujas de aire después de repetir el proceso anterior varias veces, realice el proceso manual:
 - Introduzca la punta de la pipeta de 200 µl en la membrana de goma derecha superior del array.
 - Con una pipeta, retire la mitad de la solución
 - Llene completamente el array con AH BUF
9. Retire todos los arrays sin burbujas de la estación de fluidos y levante la palanca del cartucho para acoplar el bloque de lavado.
10. Cuando se le solicite, reemplace los tubos con tinción por 3 tubos vacíos.
11. Cuando haya finalizado el lavado y la tinción, apague la estación de fluidos. Siga los pasos que se mencionan a continuación.

C. Escanear los arrays

Encienda el escáner como mínimo 10 minutos antes de usarlo.

Advertencia: El escáner emplea un láser y está equipado con un sistema de bloqueo de seguridad. No manipule el sistema de bloqueo o podría exponerse a una luz láser peligrosa.

C1. Preparar los arrays

1. Utilice un paño no abrasivo para limpiar la superficie de cristal de los arrays antes de escanearlos. No utilice alcohol.
2. Limpie el exceso de fluido que haya alrededor de las membranas de goma de la parte trasera del cartucho del array.
 - a. Cubra ambas membranas de goma con etiquetas redondas adhesivas de 9,5 mm.
 - b. Presione para aplanarlas. Si las etiquetas redondas no se aplican con facilidad, retirelas y ponga unas nuevas.

C2. Escanear los arrays

1. En el panel izquierdo del flujo de trabajo, seleccione **Scanner** (Escáner).
2. Cargue los microarrays en sentido horario en AutoLoaderDx v.2 y empiece con la posición 1.
3. En la barra de herramientas del panel Scanner Worklist (Lista de trabajo de escáner), haga clic en **Start** (Comenzar).
4. Espere a que el estado se muestre como **Complete** (Completo).
5. En la lista de trabajo Scanner (Escáner), haga clic en **Complete Step** (Completar paso). (Para acceder a los informes de solicitud de prueba (test requests) desde la lista de trabajo No activos, consulte la *Guía de usuario del módulo de software del ensayo CytoScan™ Dx*).

Advertencia: La puerta está cerrada mientras escáner está en funcionamiento. *No intente abrir la puerta.*

Nota: Para agregar arrays mientras se está ejecutando AutoLoaderDx v.2: (1) En Scanner Worklist (Lista de trabajo Escáner), haga clic en **Stop Scan** (Detener escáner). (2) Cuando se desbloquee la puerta, añada una o más arrays al escáner. (3) Haga clic en **Start** (Comenzar). *El escáner no vuelve a escanear ningún array previamente escaneado y siempre empieza con el array de la ranura 1.*

C3. Apagar la estación de fluidos

Apáguela cuando haya terminado. *No mantenga encendida la estación de fluidos si no va a volver a usarla en menos de 12 horas.*

1. Prepare 3 tubos de 1,5 ml (vacíos) para cada módulo.
2. Coloque las líneas de lavado en una botella llena de agua desionizada.
3. En el menú Fluidics (Fluidos), seleccione **Fluidics Station Setup** (Configuración de la estación de fluidos).
4. Seleccione la estación de fluidos que desee apagar y haga clic en **Shutdown Station** (Apagar estación).
5. Siga las instrucciones de la ventana LCD Fluidics Station (Estación de fluidos).
6. Cuando haya acabado, **apague** el interruptor.

11. Control de calidad durante el proceso

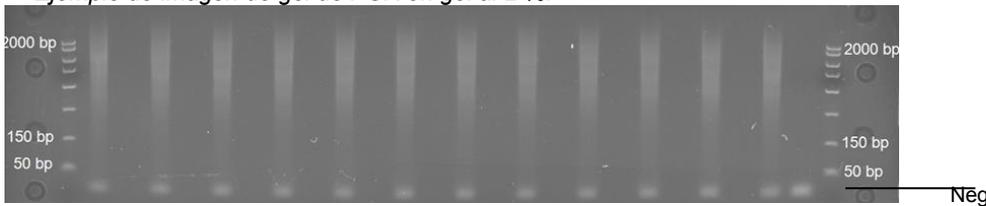
Importante: El control de calidad es un paso fundamental en el proceso y debe incluir geles de PCR y fragmentación, así como rendimiento de ADN de PCR purificado.

Use tubos en tiras o placas de 96 pocillos.

A. Producto de PCR

1. Prepare la dilución del tampón de carga.
2. Desde la primera fila, añada:
 - a. **3 µl** de producto de la PCR:
 - b. **17 µl** de tampón de carga diluido (total = 20 µl).
3. Mezcle en vórtex.
4. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
5. Cargue la mezcla en los geles.
6. Prepare las diluciones de marcadores de PCR.
7. Siga las instrucciones del fabricante para analizar gel que cumpla los requisitos tal como se muestra.

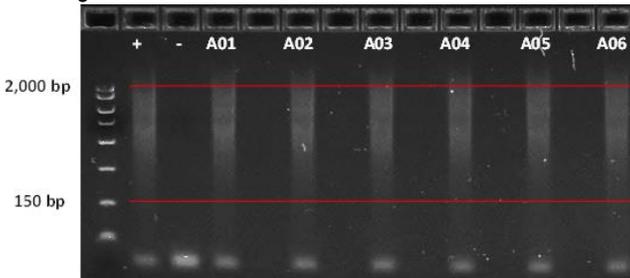
Ejemplo de imagen de gel de PCR en gel al 2 %:



A1. Requisitos-Interpretación del control de calidad de producto de PCR en gel

Distribución de las bandas **150-2.000bp**

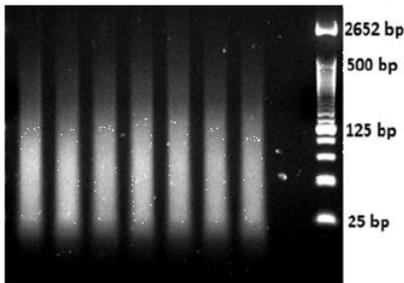
Rango de tamaños de PCR:



B. Producto fragmentado

1. Prepare la dilución del tampón de carga.
2. Añadir:
 - a. **4 µl** de producto fragmentado en:
 - b. **28 µl** de agua (dilución 1:8).
3. Añadir:
 - a. **8 µl** de producto fragmentado diluido en:
 - b. **12 µl** de tampón de carga diluido.
4. Mezcle en vórtex con impulsos.
5. Centrifugue a 650 x g durante un minuto.
6. Cargue la mezcla en los geles.
7. Prepare las diluciones de marcadores de ADN.

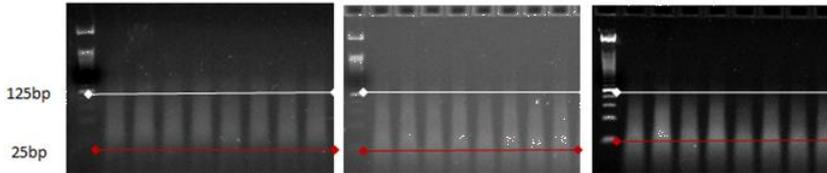
8. Siga las instrucciones del fabricante y use gel de agarosa al 4 % para cumplir con los requisitos tal como se muestra. *Ejemplo de imagen de gel de fragmentación en gel al 4 %:*



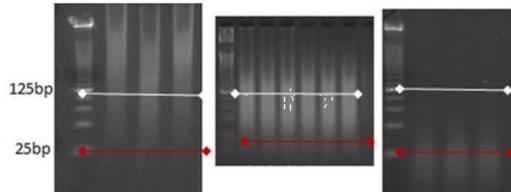
B1. Requisitos: interpretación del control de calidad de fragmentación en gel

Distribución de las bandas 25-125bp

Ejemplos de geles de fragmentación aceptables; rendimiento de aprobación además de la variabilidad en los patrones de frotis:



Ejemplos de geles de fragmentación incorrectos- Estos 3 geles tienen la mayoría de las bandas de alta intensidad por encima de 125 pb (izquierda); a 125 pb (centro); o por debajo de 25 pb (derecha):



Si la mayoría de la distribución de las bandas está en...	Entonces la muestra está...
125 pb o se extiende a 2.652 pb	Poco fragmentada (imagen izquierda y del medio)
Por debajo de 25 pb	Demasiado fragmentada (derecha)

Específico de GeneChip™ System 3000Dx

Consulte la *Guía de usuario del software de diagnóstico molecular Affymetrix™* y la *Guía de usuario del sistema GeneChip™ 3000Dx* para obtener las instrucciones de funcionamiento.

Informes

La aplicación del navegador ChAS Dx es necesaria para ver los archivos DXCHP (array CytoScan Dx). Se genera un archivo PDF con el informe del resumen de resultados para las muestras que pasan los umbrales métricos de control de calidad (CC) de array. El informe se genera con ajustes de configuración validados preestablecidos. El informe contiene los valores de la configuración, y los archivos utilizados se escriben en el informe. Ambos informes contienen los datos sociodemográficos del paciente, el médico y el laboratorio de pruebas introducidos para la muestra. Para las muestras que no pasan uno o más umbrales métricos de control de calidad del array, se genera un informe de fallos de CC.

Para obtener más detalles sobre los resultados y la interpretación, consulte la *Guía de usuario del software Chromosome Analysis Suite Dx*.

Interpretación de las pruebas; CC

El ensayo CytoScan Dx emplea tanto controles de CC durante el proceso como métricas de CC del array para ayudar a identificar problemas en el ensayo y ejemplos en los que el ensayo ha fallado (0). Consulte la *Guía de usuario del ensayo CytoScan™ Dx* para obtener información sobre cómo realizar e interpretar las comprobaciones de CC durante el proceso. Las métricas de CC del array utilizadas en el ensayo CytoScan Dx son la puntuación de mediana absoluta de la diferencia por pares (MAPD) y el control de calidad de polimorfismos de nucleótido único (SNPQC). MAPD compara las relaciones log2 de cada par de muestras adyacentes a lo largo del cromosoma y mide la variabilidad local de las relaciones log2. SNPQC mide la distancia entre picos que representan los genotipos A/A, A/B, B/B en el espacio de contraste de la señal (distancias mínimas entre picos). ChAS Dx comprueba los archivos DXCHP para los valores de CC del array. El software emite un aviso si los parámetros de CC del array no cumplen con los umbrales.

Tabla 11. Lista de métricas de CC durante el proceso y array para el ensayo CytoScan Dx.

Procesar	Limites de CC	Método de prueba de CC
CC durante el proceso		
PCR	Distribución del tamaño de las bandas del ADN 150-2.000 bp	Electroforesis en gel, agarosa al 2 %
PCR después de la purificación	Rendimiento de PCR de cada muestra $\geq 2,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$	Absorbancia a 260 nm
PCR después de la purificación	Rendimiento de PCR medio ≥ 8 muestras $\geq 3,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$	Absorbancia a 260 nm
Fragmentación	Distribución del tamaño de las bandas del ADN 25-125 bp	Electroforesis en gel, agarosa al 4 %
CC del array		
Rendimiento del array: variación marcador a marcador en largos tramos de NC constantes.	MAPD $\leq 0,25$	Cálculo ChAS Dx
Rendimiento del array: discriminación entre picos de alelos en los datos de SNP.	SNPQC ≥ 12	Cálculo ChAS Dx

Resultados esperados

La prevalencia de CNV en poblaciones de pacientes depende de factores de riesgo como la edad, el sexo, la presencia de síntomas y los antecedentes familiares. Se realizó un estudio ciego retrospectivo utilizando dos conjuntos de muestras (sindrómicas y fenotípicamente normales) para evaluar la frecuencia de las interpretaciones mediante los resultados de la prueba de CNV de CytoScan Dx. Un conjunto contenía 149 muestras de síndromes conocidos (seleccionadas por la amplitud de representación de síndromes en lugar de la prevalencia esperada en la población de uso previsto). El segundo conjunto contenía 108 muestras fenotípicamente normales. Las muestras sindrómicas y normales se recogieron en ocho centros y un centro, respectivamente. La clasificación de los síndromes se designó a partir de la compilación de pruebas rutinarias de asistencia sanitaria; la excepción fue que se excluyeron todas las muestras que incluían los resultados de microarrays SNP6.0 de Applied Biosystems. Para las muestras sindrómicas, el diagnóstico de laboratorio clínico original que las acompañaba fue el síndrome clínico diagnosticado determinado por los laboratorios externos después de la asistencia sanitaria rutinaria en pacientes remitidos para pruebas cromosómicas debido a retraso del desarrollo neurológico, retraso intelectual, anomalías congénitas o rasgos dismórficos. Para las muestras recogidas de individuos fenotípicamente normales, no se realizó un diagnóstico clínico de laboratorio original sino que se asumió que las muestras eran normales, aunque no se realizaron pruebas para determinar su estado. Un único citogenético capacitado interpretó los resultados del ensayo CytoScan Dx. En este estudio retrospectivo de sujetos con síndromes y sujetos fenotípicamente normales, el ensayo CytoScan Dx identificó un promedio de $15,4 \pm 11,5$ (media \pm DE) CNV por muestra sindrómica y $10,4 \pm 3,40$ (media \pm DE) CNV por muestra fenotípicamente normal.

El ensayo CytoScan Dx permitió interpretar correctamente 145 de 149 muestras sindrómicas, mientras que 3 muestras de 108 individuos fenotípicamente normales se interpretaron como patógenas. La interpretación del citogenético de los resultados del ensayo CytoScan Dx para este estudio se resume en la Tabla 12.

Tabla 12. La interpretación del ensayo CytoScan Dx da como resultado un conjunto de muestras sindrómicas y fenotípicamente normales.

		Muestras sindrómicas	Muestras fenotípicamente normales
Patógenas		145	3
No patógenas	VOUS	4	47
	Benignas	0	58
Total		149	108

En ambos grupos, las CNV fueron más comunes en regiones génicas que en regiones no génicas (el 77,6 % de las CNV estaban en regiones génicas) y en regiones no teloméricas o no centroméricas que en regiones teloméricas o centroméricas (el 72,7 % de las CNV estaban en regiones no teloméricas o no centroméricas).

En un estudio prospectivo multicéntrico de 960 sujetos (consulte Rendimiento clínico para obtener más información), el ensayo CytoScan Dx identificó $11,2 \pm 4,1$ (media \pm DE) CNV por sujeto.

Características de rendimiento analíticas

Reproducibilidad analítica

Para evaluar la reproducibilidad del ensayo CytoScan Dx, se realizó un estudio («centro a centro») con 93 muestras de ADN_g, incluido un control procesado por dos operadores en cada uno de los tres centros, en tres puntos temporales no consecutivos. Las 93 muestras de ADN_g presentaban anomalías que, en conjunto, cubrían el 50,8 % del genoma. Cada muestra se analizó 9 veces en los tres puntos temporales y centros, excepto una muestra de control que se analizó en cada lote y, por lo tanto, se analizó 36 veces. Se analizó la reproducibilidad de todas las CNV detectadas en las 9 réplicas por acuerdo de pares para la determinación del estado del número de copia. Se consideró que un par de réplicas concordaban si las CNV coincidían parcialmente al menos en el 50 % u 80 % de la longitud de CNV y los estados de las CNV (ganancia/pérdida) eran iguales. Se consideró que dos réplicas sin determinaciones concordaban en el cálculo de la concordancia de réplicas por pares. El porcentaje de concordancia positiva (PPA) mide la concordancia por pares condicional de ganancia o pérdida de una réplica. Se calculó la tasa de determinación como el promedio del porcentaje de réplicas que determinaron cada CNV. Se calculó la concordancia de la coincidencia parcial en función del número (Tabla 13A) o el tamaño (Tabla 13B) de marcador. También se evaluó la reproducibilidad para determinar el número de copias y la localización (concordancia de criterio de valoración) de cada CNV. Para determinar la estimación de exactitud para localizar una CNV, se calculó el % del coeficiente de variación de la longitud de la CNV, el % de la mediana de la desviación absoluta del criterio de valoración y la desviación estándar de los criterios de valoración (tanto el izquierdo como el derecho). Los resultados se agrupan por intervalo de tamaños y número de marcador y se separan para todos los datos, excluyendo las regiones hipervariables definidas por la empresa. En el cuadro 1 se muestra una descripción de las métricas, y en las Tablas 13A-I se presentan los resultados del estudio de reproducibilidad de centro a centro.

Cuadro 1. Explicación de la terminología

- El % de *coincidencia parcial* es la coincidencia parcial promedio (como porcentaje de la longitud de CNV) de cada réplica por pares.
- La *concordancia de réplicas por pares* se determinó examinando todos los pares de réplicas de la coincidencia parcial del 50 % u 80 % de la longitud de CNV, resumidas (para 9 réplicas) de la siguiente manera:

$$\sum_{i=1}^9 \sum_{j>i}^9 Pr\{rep_i = rep_j\} / 36$$

Se considera que dos réplicas concuerdan (o son iguales) si las CNV coinciden al menos al 50 % (o al 80 %) y tienen los mismos estados del número de copias. Se considera que dos réplicas sin determinaciones concuerdan.

- La *concordancia de porcentaje positivo (PPA)* mide la concordancia por pares condicional de la ganancia o pérdida de una réplica, resumida (para 9 réplicas) de la siguiente manera:

$$\sum_{i=1}^9 \sum_{j=1 \& i \neq j}^9 Pr\{rep_i = rep_j | rep_i = gain \text{ or } loss\} / 8 * \sum_{i=1}^9 Pr\{rep_i = gain \text{ or } loss\}$$

Se considera que dos réplicas concuerdan (o son iguales) si las CNV coinciden al menos al 50 % (o al 80 %) y tienen los mismos estados del número de copias.

- La *tasa de determinación* se calcula como el promedio del porcentaje de réplicas que determina cada CNV.
- Longitud, % de coeficiente de variación (% de CV)*- es el % de CV de cada CNV, calculado tanto en kb como en marcadores. Para mayor claridad, el CV se calcula como la desviación estándar dividida por la longitud media entre las réplicas (% de CV = DE/media). Se presentan la media, el mínimo, la mediana y el máximo en todos los grupos estratificados de CNV.
- % de la mediana de la desviación absoluta del criterio de valoración* - para cada CNV, se determinó el criterio de valoración medio izquierdo y derecho. Para cada réplica de CNV, se calculó la distancia desde el criterio de valoración medio para los criterios de valoración izquierdo y derecho (D_L y D_R , respectivamente). Se calculó la distancia combinada entre los criterios de valoración, $D_L + D_R$. El error de los criterios de valoración fraccionario es la distancia combinada entre los criterios de valoración dividida por la longitud de CNV y expresada como porcentaje. Para las CNV con mediciones replicadas, los criterios de valoración de las CNV son e_L y e_R , y los criterios de valoración medios izquierdo y derecho se definen como \tilde{e}_L y \tilde{e}_R , respectivamente. Para cada medición replicada, la distancia absoluta de los criterios de valoración de CNV desde las medianas, $D_L = |e_L - \tilde{e}_L|$ y $D_R = |e_R - \tilde{e}_R|$.

$$\% \text{ de error del criterio de valoración} = \frac{D_L + D_R}{e_R - e_L + 1} \times 100$$

% de la mediana de la desviación absoluta del criterio de valoración = % de error de los

- La *desviación estándar* resultante de identificar cada criterio de valoración es la desviación estándar del criterio de valoración, distinguiendo entre el derecho y el izquierdo.

Tabla 13A. Reproducibilidad de CNV agrupadas por estado (ganancias y pérdidas) y número de marcador en función de la tasa de determinación, la concordancia por pares entre réplicas y el porcentaje de concordancia positiva (PPA) para dos criterios (coincidencia parcial de 50 % y 80 %) en todas las regiones del estudio de centro a centro.

Estado	Rango de CNV (marcadores)	N.º de CNV	Tasa de determinación*	Concordancia de réplicas por pares*		PPA*	
				Coincidencia parcial			
				50 %	80 %	50 %	80 %
Ganancia	50-75	230	49,7	70,8	68,7	72,7	68,7
	75-100	150	68,3	70,2	54,7	77,4	54,3
	100-150	131	70,2	81,5	71,6	86,5	73,0
	150-200	68	82,5	87,8	81,7	91,0	83,8
	200-300	72	92,4	91,0	81,1	92,4	81,9
	300-400	8	100,0	100,0	98,9	100,0	98,9
	400-1.000	22	100,0	97,5	95,9	97,5	95,9
	1.000-3.000	22	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	3.000-5.000	7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	5.000+	60	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Total	770	71,4	79,8	72,5	85,3	75,3
Pérdida	25-50	430	48,8	79,5	76,4	75,4	68,0
	50-75	204	74,8	77,7	69,0	84,2	72,9
	75-100	107	81,9	87,5	80,7	92,1	83,8
	100-150	58	82,4	85,2	78,8	87,6	79,9
	150-200	24	86,4	82,4	69,4	85,1	70,2
	200-300	26	96,1	92,5	85,4	93,9	86,7
	300-400	12	100,0	94,2	83,0	94,2	83,0
	400-1.000	37	100,0	95,2	77,4	95,2	77,4
	1.000-3.000	26	100,0	100,0	99,9	100,0	99,9
	3.000-5.000	12	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	5.000+	41	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Total	977	68,9	83,9	78,7	87,0	79,3
Todo	Total	1.747	70,0	82,2	76,1	86,3	77,5

* Consulte el cuadro 1 para ver las descripciones de los parámetros de la tabla.

Tabla 13B. Reproducibilidad de CNV agrupadas por estado (ganancias y pérdidas) y tamaños (en kb) en función de la tasa de determinación, la concordancia por pares entre réplicas y el porcentaje de concordancia positiva (PPA) para dos criterios (coincidencia parcial de 50 % y 80 %) en todas las regiones del estudio de centro a centro.

Estado	Rango de CNV (kb)	N.º de CNV	Tasa de determinación*	Concordancia de réplicas por pares*		PPA*	
				Coincidencia parcial			
				50 %	80 %	50 %	80 %
Ganancia	50-75	99	50,4	71,4	67,2	70,4	62,1
	75-100	98	63,7	70,7	62,6	74,4	63,1
	100-150	149	64,9	70,8	63,6	76,3	65,2
	150-200	101	62,3	65,7	47,1	64,9	36,4
	200-300	100	78,2	73,3	67,5	78,1	70,8
	300-400	27	68,6	70,3	65,3	71,5	64,2
	400-1.000	94	88,8	86,8	71,3	89,5	70,7
	1.000-3.000	39	86,6	87,4	78,5	90,5	80,2
	3.000-5.000	3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		5.000+	60	100,0	99,1	98,4	99,1
	Total	770	71,4	75,5	66,5	79,4	67,0
Pérdida	25-50	351	53,7	78,8	73,9	78,5	68,8
	50-75	177	65,6	77,9	70,1	76,7	63,2
	75-100	88	66,9	77,4	68,5	72,4	57,1
	100-150	133	80,9	82,4	76,3	88,0	80,7
	150-200	30	73,6	82,5	80,1	85,5	82,2
	200-300	29	86,4	81,8	62,9	84,8	63,0
	300-400	35	88,3	89,8	69,5	91,0	68,1
	400-1.000	43	86,9	89,1	74,4	91,9	74,9
	1.000-3.000	35	98,5	96,3	92,8	96,8	93,3
	3.000-5.000	16	60,0	84,2	84,2	86,9	86,9
	5.000+	40	100,0	100,0	99,9	100,0	99,9
	Total	977	68,9	82,4	75,9	84,7	75,1
Todo	Total	1.747	70,0	79,4	71,9	82,4	71,5

* Consulte el cuadro 1 para ver las descripciones de los parámetros de la tabla.

Tabla 13C. Reproducibilidad de CNV agrupadas por estado (ganancias y pérdidas) y número de marcador en función de la tasa de determinación, la concordancia por pares entre réplicas y el porcentaje de concordancia positiva (PPA) para dos criterios (coincidencia parcial de 50 % y 80 %) en regiones que excluyen las regiones hipervariables definidas por la empresa en el estudio de centro a centro.

Estado	Rango de CNV (marcadores)	N.º de CNV	Tasa de determinación*	Concordancia de réplicas por pares*		PPA*	
				Coincidencia parcial			
				50 %	80 %	50 %	80 %
Ganancia	50-75	166	45,4	75,1	73,6	74,7	71,6
	75-100	34	57,0	77,9	73,7	75,5	66,5
	100-150	75	63,6	85,1	76,9	88,3	76,4
	150-200	48	78,7	90,8	88,9	94,0	91,8
	200-300	36	85,6	91,3	87,3	94,0	89,3
	300-400	8	100,0	100,0	98,9	100,0	98,9
	400-1.000	22	100,0	97,5	95,9	97,5	95,9
	1.000-3.000	22	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	3.000-5.000	7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	5.000+	60	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Total	478	68,9	85,4	82,5	89,1	85,0
Pérdida	25-50	387	49,8	81,0	78,1	77,4	70,6
	50-75	74	71,5	84,8	82,8	89,0	86,4
	75-100	67	92,1	95,5	89,0	97,2	90,1
	100-150	42	82,7	87,0	82,8	88,5	83,4
	150-200	19	86,9	84,9	74,9	87,3	75,8
	200-300	16	99,5	99,4	96,7	99,6	96,9
	300-400	8	100,0	100,0	94,9	100,0	94,9
	400-1.000	17	100,0	100,0	99,8	100,0	99,8
	1.000-3.000	26	100,0	100,0	99,9	100,0	99,9
	3.000-5.000	12	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	5.000+	41	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Total	709	67,9	87,3	84,5	89,8	85,6	
Todo	Total	1.187	68,3	86,6	83,8	89,5	85,4

* Consulte el cuadro 1 para ver las descripciones de los parámetros de la tabla.

Tabla 13D. Reproducibilidad de CNV agrupadas por estado (ganancias y pérdidas) y tamaños (kb) en función de la tasa de determinación, la concordancia por pares entre réplicas y el porcentaje de concordancia positiva (PPA) para dos criterios (coincidencia parcial de 50 % y 80 %) en regiones que excluyen las regiones hipervariables definidas por la empresa en el estudio de centro a centro.

Estado	Rango de CNV (kb)	N.º de CNV	Tasa de determinación*	Concordancia de réplicas por pares*		PPA*	
				Coincidencia parcial			
				50 %	80 %	50 %	80 %
Ganancia	50-75	79	49,5	75,4	73,4	74,2	70,1
	75-100	55	58,3	75,9	73,0	75,0	70,9
	100-150	89	66,8	79,8	74,0	84,2	75,7
	150-200	48	43,5	77,6	74,0	71,5	63,0
	200-300	56	80,3	90,9	89,4	93,9	92,1
	300-400	17	71,1	80,0	74,8	81,2	73,9
	400-1.000	32	73,8	78,7	76,2	78,6	74,4
	1.000-3.000	39	86,6	87,4	78,5	90,5	80,2
	3.000-5.000	3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	5.000+	60	100,0	99,1	98,4	99,1	98,4
Total	478	68,9	82,6	79,2	85,1	80,4	
Pérdida	25-50	286	54,3	81,0	77,2	80,9	73,4
	50-75	115	65,4	85,6	81,8	84,8	77,8
	75-100	54	59,6	81,2	77,2	74,0	65,8
	100-150	68	82,2	93,1	89,3	95,3	91,0
	150-200	26	75,7	85,3	84,2	87,8	86,4
	200-300	21	85,6	87,4	73,6	89,9	73,7
	300-400	17	75,8	83,5	76,4	84,4	75,1
	400-1.000	31	82,0	87,6	78,8	91,3	80,5
	1.000-3.000	35	98,5	96,3	92,8	96,8	93,3
	3.000-5.000	16	60,0	84,2	84,2	86,9	86,9
5.000+	40	100,0	100,0	99,9	100,0	99,9	
Total	709	67,9	86,4	82,7	88,4	82,8	
Todo	Total	1.187	68,3	85,0	81,4	87,2	81,8

* Consulte el cuadro 1 para ver las descripciones de los parámetros de la tabla.

Se evaluó la reproducibilidad de la concordancia de números de copia: el ensayo CytoScan Dx determina el número de copias de cada CNV identificado como 0, 1, 2, 3 o 4. Para la concordancia de números de copias, se evaluó la reproducibilidad del número de copia numérica comparando por pares todas las mediciones repetidas de cada CNV. Las comparaciones por pares con un número de copias con coincidencia exacta se registraron como concordantes. En las tablas de resumen se presenta la fracción de las comparaciones por pares calificadas como % de concordancia, para cada tamaño de recipiente. Concordancia = número de comparaciones por pares coincidentes * 100 / número total de comparaciones por pares, donde la coincidencia se define como tener números de copia idénticos para ambos pares. La concordancia del número de copias se evaluó independientemente de la ubicación, el tamaño o la concordancia del número de muestra. Cabe destacar que este cálculo de concordancia es distinto al de las Tablas 13A-D, ya que se basa en un número de copia idéntico, no solo en el estado del número de copia. Los resultados se muestran en la Tabla 13E.

Tabla 13E. Reproducibilidad del número de copias en el estudio de reproducibilidad de centro a centro.

		Todas las regiones (marcadores)		Todas las regiones (kb)		Regiones que excluyen las regiones hipervariables definidas por la empresa (marcadores)		Regiones que excluyen las regiones hipervariables definidas por la empresa (kb)	
		CNV (N)	% de concordancia	CNV (N)	% de concordancia	CNV (N)	% de concordancia	CNV (N)	% de concordancia
Ganancia	50-75	230	69,6 %	99	71,1 %	166	73,5 %	79	74,3 %
	75-100	150	70,7 %	98	78,0 %	34	78,6 %	55	87,5 %
	100-150	131	81,9 %	149	71,2 %	75	86,3 %	89	78,7 %
	150-200	68	90,1 %	101	77,5 %	48	91,6 %	48	79,7 %
	200-300	72	93,5 %	100	80,4 %	36	90,5 %	56	90,5 %
	300-400	8	100,0 %	27	79,7 %	8	100,0 %	17	86,7 %
	400-1.000	22	98,1 %	94	88,3 %	22	98,1 %	32	82,0 %
	1.000-3.000	22	97,4 %	39	89,7 %	22	97,4 %	39	89,7 %
	3.000-5.000	7	100,0 %	3	100,0 %	7	100,0 %	3	100,0 %
	5.000+	60	93,6 %	60	93,6 %	60	93,6 %	60	93,6 %
	Todo	770	79,6 %	770	79,6 %	478	84,3 %	478	84,3 %
Pérdida	25-50	430	79,3 %	351	78,8 %	387	81,0 %	286	81,1 %
	50-75	204	79,5 %	177	82,7 %	74	86,3 %	115	87,7 %
	75-100	107	88,0 %	88	87,0 %	67	96,2 %	54	87,4 %
	100-150	58	90,7 %	133	85,2 %	42	93,0 %	68	94,2 %
	150-200	24	90,5 %	30	86,3 %	19	91,8 %	26	89,0 %
	200-300	26	97,0 %	29	89,2 %	16	99,6 %	21	92,2 %
	300-400	12	100,0 %	35	95,5 %	8	100,0 %	17	90,5 %
	400-1.000	37	100,0 %	43	92,4 %	17	100,0 %	31	89,5 %
	1.000-3.000	26	100,0 %	35	98,9 %	26	100,0 %	35	98,9 %
	3.000-5.000	12	100,0 %	16	84,2 %	12	100,0 %	16	84,2 %
	5.000+	41	100,0 %	40	100,0 %	41	100,0 %	40	100,0 %
Todo	977	85,1 %	977	85,1 %	709	87,9 %	709	87,9 %	
Todo		1.747	82,7 %	1.747	82,7 %	1.187	86,6 %	1.187	86,6 %

* Concordancia = número de comparaciones por pares coincidentes * 100 / número total de comparaciones por pares, donde la coincidencia se define como tener números de copia idénticos para ambos pares. La concordancia del número de copias se evaluó independientemente de la ubicación, el tamaño o la concordancia del número de muestra.

Tabla 13F. Reproducibilidad de la longitud y los criterios de valoración de CNV (en marcadores) todas las regiones del estudio de centro a centro.*

Ganancia/ pérdida	Rango de CNV (marcadores)	N	% de CV de la longitud de CNV	% de coincidencia parcial promedio	% de la mediana de la desviación absoluta del criterio de valoración	DE izquierda del criterio de valoración (M)	DE derecha del criterio de valoración (M)
			Media (mín., mediana, máx.)		Media (mín., mediana, máx.)		
Ganancia	50-75	157	5,1 (0,0; 4,1; 30,1)	68,5	0,03 (0,00; 0,01; 0,22)	1,8 (0,0; 1,2; 12,5)	2,2 (0,0; 1,6; 11,3)
	75-100	136	11,6 (0,0; 11,4; 29,9)	63,8	0,06 (0,00; 0,04; 0,30)	8,1 (0,0; 8,4; 27,9)	4,6 (0,0; 2,0; 21,6)
	100-150	111	11,7 (0,0; 7,0; 66,2)	76,9	0,06 (0,00; 0,02; 0,63)	10,1 (0,0; 3,0; 78,1)	6,2 (0,0; 2,1; 48,8)
	150-200	59	11,7 (0,3; 4,5; 54,2)	85,0	0,05 (0,00; 0,01; 0,47)	15,1 (0,0; 3,3; 107,5)	9,8 (0,0; 2,8; 93,4)
	200-300	68	9,7 (0,0; 5,9; 76,5)	86,1	0,05 (0,00; 0,02; 0,77)	12,5 (0,0; 5,4; 79,3)	13,2 (0,0; 9,6; 166,9)
	300-400	8	1,9 (0,0; 1,0; 7,9)	98,1	0,01 (0,00; 0,01; 0,02)	1,4 (0,0; 1,3; 3,1)	5,7 (0,0; 2,6; 24,1)
	400-1.000	22	2,7 (0,0; 0,5; 38,9)	95,8	0,02 (0,00; 0,00; 0,28)	12,5 (0,0; 1,4; 210,1)	10,3 (0,0; 1,9; 152,7)
	1.000-3.000	22	0,3 (0,0; 0,2; 1,4)	99,3	0,00 (0,00; 0,00; 0,01)	3,0 (0,0; 1,4; 15,6)	3,2 (0,0; 1,5; 34,1)
	3.000-5.000	7	0,3 (0,0; 0,1; 1,1)	99,5	0,00 (0,00; 0,00; 0,00)	4,3 (0,0; 3,1; 11,3)	7,7 (0,0; 0,5; 41,8)
	5.000+	60	0,0 (0,0; 0,0; 0,5)	99,7	0,00 (0,00; 0,00; 0,00)	3,1 (0,0; 0,9; 55,0)	2,0 (0,0; 0,6; 25,5)
Total	650	7,8 (0,4, 3, 76,5)	76,1	0,04 (0,00; 0,01; 0,77)	7,4 (0,0; 2,3; 210,1)	5,6 (0,0; 2,0; 166,9)	
Pérdida	25-50	282	6,9 (0,0; 5,4; 63,7)	77,3	0,04 (0,00; 0,02; 0,48)	1,4 (0,0; 1,0; 18,4)	1,8 (0,0; 0,9; 26,8)
	50-75	186	13,1 (0,0; 8,2; 73,1)	73,3	0,08 (0,00; 0,03; 0,71)	3,5 (0,0; 1,7; 22,4)	6,2 (0,0; 3,5; 42,4)
	75-100	101	8,2 (0,0; 5,2; 33,1)	82,9	0,04 (0,00; 0,01; 0,30)	3,3 (0,0; 1,7; 22,4)	4,7 (0,0; 2,8; 22,6)
	100-150	51	10,8 (0,0; 1,9; 66,0)	82,9	0,06 (0,00; 0,01; 0,53)	8,6 (0,0; 1,4; 71,6)	6,5 (0,0; 1,6; 70,5)
	150-200	22	14,2 (0,0; 5,4; 57,7)	78,6	0,04 (0,00; 0,01; 0,23)	17,3 (0,0; 3,0; 109,7)	10,5 (0,0; 3,5; 78,9)
	200-300	26	14,7 (0,0; 6,8; 68,1)	90,5	0,07 (0,00; 0,02; 0,33)	27,8 (0,0; 5,8; 136,0)	8,4 (0,0; 1,7; 46,9)
	300-400	12	8,3 (0,3; 1,1; 62,8)	90,0	0,04 (0,00; 0,00; 0,41)	19,0 (0,0; 1,4; 204,9)	10,7 (0,0; 1,8; 63,9)
	400-1.000	37	8,2 (0,0; 3,2; 50,0)	87,6	0,04 (0,00; 0,02; 0,26)	41,5 (0,0; 12,2; 216,5)	6,5 (0,0; 5,2; 21,4)
	1.000-3.000	26	0,5 (0,0; 0,2; 6,1)	99,1	0,00 (0,00; 0,00; 0,01)	5,1 (0,0; 0,9; 42,5)	5,1 (0,0; 2,0; 65,9)
	3.000-5.000	12	0,1 (0,0; 0,0; 0,1)	99,3	0,00 (0,00; 0,00; 0,00)	1,1 (0,0; 0,7; 3,2)	1,4 (0,0; 1,1; 5,3)
5.000+	41	0,0 (0,0; 0,0; 0,3)	99,8	0,00 (0,00; 0,00; 0,00)	1,5 (0,0; 1,1; 6,2)	1,8 (0,0; 0,5; 21,9)	
Total	796	8,6 (0,0; 4,8; 73,1)	81,1	0,05 (0,00; 0,01; 0,71)	6,2 (0,0; 1,4; 216,5)	4,4 (0,0; 1,5; 78,9)	
Todo	Total	1.446	8,3 (0,0; 4,6; 76,5)	79,0	0,04 (0,00; 0,01; 0,77)	6,7 (0,0; 1,7; 216,5)	4,9 (0,0; 1,8; 166,9)

* Consulte el cuadro 1 para ver las descripciones de los parámetros de la tabla.

Tabla 13G. Reproducibilidad de la longitud y los criterios de valoración de CNV (en kb) todas las regiones del estudio de centro a centro.*

Ganancia/ pérdida	Rango de CNV (kb)	N	% de CV de la longitud de CNV	% de coincidencia parcial promedio	% de la mediana de la desviación absoluta del criterio de valoración	DE izquierda del criterio de valoración (kb)	DE derecha del criterio de valoración (kb)
			Media (mín., mediana, máx.)		Media (mín., mediana, máx.)		
Ganancia	50-75	67	9,1 (0,0; 3,9; 54,8)	69,6	0,04 (0,00; 0,00; 0,37)	5,1 (0,0; 0,9; 40,2)	2,9 (0,0; 1,1; 14,0)
	75-100	77	11,7 (0,0; 8,9; 55,6)	68,6	0,06 (0,00; 0,02; 0,56)	7,6 (0,0; 4,4; 46,8)	7,3 (0,0; 5,7; 52,7)
	100-150	130	13,8 (0,0; 6,4; 65,8)	67,4	0,07 (0,00; 0,00; 0,59)	13,6 (0,0; 5,5; 63,8)	7,0 (0,0; 2,6; 61,4)
	150-200	76	35,9 (0,0; 29,7; 137,4)	62,6	0,13 (0,00; 0,09; 0,62)	31,6 (0,0; 31,5; 91,7)	37,2 (0,0; 16,6; 253,5)
	200-300	89	25,5 (0,0; 6,4; 118,6)	70,8	0,07 (0,00; 0,01; 0,68)	22,8 (0,0; 9,1; 238,5)	43,5 (0,0; 5,5; 269,0)
	300-400	23	41,9 (0,0; 14,1; 144,4)	69,2	0,42 (0,00; 0,02; 2,23)	24,8 (0,0; 5,1; 298,4)	123,8 (0,0; 15,2; 488,7)
	400-1.000	90	16,2 (0,0; 9,8; 100,6)	79,3	0,08 (0,00; 0,04; 1,21)	36,7 (0,0; 16,8; 358,2)	71,8 (0,0; 44,7; 695,3)
	1.000-3.000	35	12,1 (0,0; 1,4; 61,7)	83,8	0,06 (0,00; 0,00; 0,44)	106,2 (0,0; 4,5; 538,4)	83,8 (0,0; 3,2; 1.011,9)
	3.000-5.000	3	0,8 (0,1; 0,2; 2,1)	98,9	0,00 (0,00; 0,00; 0,00)	20,1 (2,2; 6,9; 51,1)	20,4 (0,0; 4,8; 56,5)
	5.000+	60	3,0 (0,0; 0,0; 146,8)	98,6	0,00 (0,00; 0,00; 0,03)	183,1 (0,0; 0,3; 10.583,8)	352,8 (0,0; 0,0; 11.297,1)
Total	650	17,4 (0,0; 7,2; 146,8)	72,4	0,08 (0,00; 0,01; 2,23)	39,6 (0,0; 5,4; 10.583,8)	64,4 (0,0; 4,7; 11.297,1)	
Pérdida	25-50	252	9,5 (0,0; 6,6; 60,3)	76,3	0,04 (0,00; 0,00; 0,66)	2,0 (0,0; 0,1; 22,9)	2,8 (0,0; 1,3; 24,3)
	50-75	145	20,3 (0,0; 12,7; 71,4)	75,4	0,08 (0,00; 0,02; 0,68)	8,4 (0,0; 4,0; 43,4)	6,1 (0,0; 3,6; 33,8)
	75-100	69	25,7 (0,0; 12,5; 115,9)	76,2	0,12 (0,00; 0,03; 0,50)	18,2 (0,0; 8,2; 116,5)	7,2 (0,0; 3,3; 47,0)
	100-150	121	11,7 (0,0; 8,1; 57,3)	79,5	0,03 (0,00; 0,00; 0,38)	8,0 (0,0; 1,6; 78,5)	8,0 (0,0; 3,8; 40,3)
	150-200	24	10,6 (0,2; 2,8; 104,1)	80,6	0,03 (0,00; 0,00; 0,36)	14,6 (0,0; 3,5; 163,9)	3,7 (0,0; 1,8; 43,9)
	200-300	27	16,2 (0,0; 14,3; 53,4)	76,2	0,07 (0,00; 0,02; 0,42)	29,4 (0,0; 13,1; 128,7)	15,0 (0,0; 3,5; 79,3)
	300-400	32	12,9 (0,0; 7,7; 94,8)	82,2	0,03 (0,00; 0,02; 0,17)	35,3 (0,0; 22,4; 293,4)	13,0 (0,0; 3,9; 184,3)
	400-1.000	40	17,2 (0,0; 5,8; 167,4)	82,4	0,10 (0,00; 0,01; 1,26)	55,2 (0,0; 8,9; 466,3)	54,7 (0,0; 8,3; 1.442,1)
	1.000-3.000	35	3,2 (0,0; 0,4; 33,4)	94,5	0,01 (0,00; 0,00; 0,10)	21,3 (0,0; 1,1; 342,6)	28,5 (0,0; 4,7; 202,4)

Ganancia/pérdida	Rango de CNV (kb)	N	% de CV de la longitud de CNV	% de coincidencia parcial promedio	% de la mediana de la desviación absoluta del criterio de valoración	DE izquierda del criterio de valoración (kb)	DE derecha del criterio de valoración (kb)
			Media (mín., mediana, máx.)		Media (mín., mediana, máx.)		
	3.000-5.000	11	0,3 (0,0; 0,0; 2,6)	83,9	0,00 (0,00; 0,00; 0,00)	11,4 (0,0; 0,0; 117,9)	4,0 (0,0; 0,0; 24,6)
	5.000+	40	0,5 (0,0; 0,0; 9,4)	99,6	0,00 (0,00; 0,00; 0,06)	8,1 (0,0; 0,6; 164,7)	50,9 (0,0; 0,1; 1.484,5)
	Total	796	13,1 (0,0; 7,0; 167,4)	79,8	0,05 (0,00; 0,00; 1,26)	12,1 (0,0; 1,6; 466,3)	11,6 (0,0; 2,3; 1.484,5)
Todo	Total	1.446	15,1 (0,0; 7,1; 167,4)	76,6	0,07 (0,00; 0,00; 2,23)	24,5 (0,0; 2,9; 10.583,8)	35,3 (0,0; 3,0; 11.297,1)

* Consulte el cuadro 1 para ver las descripciones de los parámetros de la tabla.

Tabla 13H. Reproducibilidad de la longitud y los criterios de valoración de CNV (en marcadores) en regiones que excluyen regiones hipervariables definidas por la empresa en el estudio de centro a centro.*

Ganancia/pérdida	Rango de CNV (marcadores)	N	% de CV de la longitud de CNV	% de coincidencia parcial promedio	% de la mediana de la desviación absoluta del criterio de valoración	DE izquierda del criterio de valoración (M)	DE derecha del criterio de valoración (M)
			Media (mín., mediana, máx.)		Media (mín., mediana, máx.)		
Ganancia	50-75	97	4,3 (0,0; 2,6; 30,1)	73,1	0,03 (0,00; 0,02; 0,22)	1,9 (0,0; 1,4; 12,5)	1,5 (0,0; 1,0; 11,3)
	75-100	23	7,5 (0,0; 5,4; 29,7)	75,6	0,05 (0,00; 0,02; 0,26)	3,9 (0,0; 2,0; 13,5)	4,2 (0,0; 2,1; 21,6)
	100-150	56	11,7 (0,0; 3,4; 66,2)	81,3	0,08 (0,00; 0,02; 0,63)	10,8 (0,0; 2,4; 78,1)	6,8 (0,0; 2,6; 48,8)
	150-200	39	6,9 (0,3; 1,7; 54,2)	89,0	0,03 (0,00; 0,01; 0,23)	8,4 (0,0; 2,0; 65,1)	5,6 (0,0; 1,5; 93,4)
	200-300	32	7,9 (0,0; 2,4; 76,5)	88,1	0,05 (0,00; 0,01; 0,77)	9,4 (0,0; 2,0; 79,3)	11,4 (0,0; 2,4; 166,9)
	300-400	8	1,9 (0,0; 1,0; 7,9)	98,1	0,01 (0,00; 0,01; 0,02)	1,4 (0,0; 1,3; 3,1)	5,7 (0,0; 2,6; 24,1)
	400-1.000	22	2,7 (0,0; 0,5; 38,9)	95,8	0,02 (0,00; 0,00; 0,28)	12,5 (0,0; 1,4; 210,1)	10,3 (0,0; 1,9; 152,7)
	1.000-3.000	22	0,3 (0,0; 0,2; 1,4)	99,3	0,00 (0,00; 0,00; 0,01)	3,0 (0,0; 1,4; 15,6)	3,2 (0,0; 1,5; 34,1)
	3.000-5.000	7	0,3 (0,0; 0,1; 1,1)	99,5	0,00 (0,00; 0,00; 0,00)	4,3 (0,0; 3,1; 11,3)	7,7 (0,0; 0,5; 41,8)
	5.000+	60	0,0 (0,0; 0,0; 0,5)	99,7	0,00 (0,00; 0,00; 0,00)	3,1 (0,0; 0,9; 55,0)	2,0 (0,0; 0,6; 25,5)
	Total	366	5,1 (0,0; 1,6; 76,5)	83,2	0,03 (0,00; 0,00; 0,77)	5,7 (0,0; 1,7; 210,1)	4,7 (0,0; 1,4; 166,9)
Pérdida	25-50	250	6,3 (0,0; 4,9; 63,7)	78,8	0,03 (0,00; 0,02; 0,48)	1,5 (0,0; 1,1; 18,4)	1,5 (0,0; 0,8; 26,8)
	50-75	61	7,5 (0,0; 2,9; 73,1)	83,0	0,05 (0,00; 0,02; 0,71)	1,5 (0,0; 0,7; 11,2)	3,7 (0,0; 1,4; 42,4)
	75-100	64	6,4 (0,0; 3,1; 33,1)	91,1	0,02 (0,00; 0,00; 0,30)	2,7 (0,0; 1,3; 22,4)	3,6 (0,0; 1,5; 20,9)
	100-150	36	8,3 (0,0; 1,6; 55,1)	85,6	0,04 (0,00; 0,00; 0,46)	4,5 (0,0; 1,3; 65,1)	6,9 (0,0; 0,9; 70,5)
	150-200	17	9,5 (0,0; 2,1; 50,7)	81,7	0,02 (0,00; 0,01; 0,12)	7,7 (0,0; 1,9; 40,7)	10,7 (0,0; 1,7; 78,9)
	200-300	16	4,6 (0,0; 1,0; 19,2)	97,7	0,03 (0,00; 0,01; 0,21)	3,9 (0,0; 0,8; 19,7)	7,2 (0,0; 1,4; 43,5)
	300-400	8	3,0 (0,3; 0,5; 19,1)	96,5	0,01 (0,00; 0,00; 0,09)	1,1 (0,0; 0,7; 4,1)	9,5 (0,9; 1,8; 63,9)
	400-1.000	17	0,7 (0,0; 0,3; 2,9)	97,8	0,00 (0,00; 0,00; 0,02)	2,0 (0,0; 0,0; 11,9)	2,5 (0,0; 1,4; 21,4)
	1.000-3.000	26	0,5 (0,0; 0,2; 6,1)	99,1	0,00 (0,00; 0,00; 0,01)	5,1 (0,0; 0,9; 42,5)	5,1 (0,0; 2,0; 65,9)
	3.000-5.000	12	0,1 (0,0; 0,0; 0,1)	99,3	0,00 (0,00; 0,00; 0,00)	1,1 (0,0; 0,7; 3,2)	1,4 (0,0; 1,1; 5,3)
	5.000+	41	0,0 (0,0; 0,0; 0,3)	99,8	0,00 (0,00; 0,00; 0,00)	1,5 (0,0; 1,1; 6,2)	1,8 (0,0; 0,5; 21,9)
	Total	548	5,5 (0,0; 2,7; 73,1)	85,2	0,03 (0,00; 0,00; 0,71)	2,3 (0,0; 1,1; 65,1)	3,2 (0,0; 1,1; 78,9)
Todo	Total	914	5,3 (0,0; 2,2; 76,5)	84,5	0,03 (0,00; 0,00; 0,77)	3,6 (0,0; 1,3; 210,1)	3,8 (0,0; 1,3; 166,9)

* Consulte el cuadro 1 para ver las descripciones de los parámetros de la tabla.

Tabla 131. Reproducibilidad de la longitud y los criterios de valoración de CNV (en kb) en regiones que excluyen regiones hipervariables definidas por la empresa en el estudio de centro a centro.

Ganancia/pérdida	Rango de CNV (kb)	N	% de CV de la longitud de CNV	% de coincidencia parcial promedio	% de la mediana de la desviación absoluta del criterio de valoración	DE izquierda del criterio de valoración (kb)	DE derecha del criterio de valoración (kb)
			Media (mín., mediana, máx.)		Media (mín., mediana, máx.)		
Ganancia	50-75	48	6,2 (0,0; 2,0; 54,8)	74,2	0,01 (0,00; 0,00; 0,18)	3,2 (0,0; 0,4; 40,2)	1,6 (0,0; 0,0; 8,4)
	75-100	36	10,8 (0,0; 6,2; 55,6)	76,9	0,06 (0,00; 0,00; 0,51)	7,4 (0,0; 3,1; 46,8)	6,8 (0,0; 3,0; 52,7)
	100-150	72	11,8 (0,0; 5,5; 55,1)	76,3	0,05 (0,00; 0,00; 0,46)	12,5 (0,0; 4,0; 63,8)	4,3 (0,0; 1,6; 56,4)
	150-200	24	10,5 (0,0; 3,2; 61,7)	76,2	0,05 (0,00; 0,00; 0,36)	10,9 (0,0; 4,2; 51,8)	9,1 (0,0; 0,7; 114,7)
	200-300	47	8,0 (0,0; 2,9; 89,3)	88,5	0,02 (0,00; 0,00; 0,40)	15,0 (0,0; 3,7; 238,5)	7,6 (0,0; 4,1; 99,3)
	300-400	13	24,1 (0,0; 5,5; 144,4)	78,9	0,05 (0,00; 0,01; 0,40)	34,8 (0,0; 8,0; 298,4)	55,2 (0,0; 3,2; 488,7)
	400-1.000	28	16,1 (0,0; 1,8; 100,6)	77,8	0,08 (0,00; 0,01; 1,21)	41,2 (0,0; 3,6; 358,2)	78,0 (0,0; 5,4; 695,3)
	1.000-3.000	35	12,1 (0,0; 1,4; 61,7)	83,8	0,06 (0,00; 0,00; 0,44)	106,2 (0,0; 4,5; 538,4)	83,8 (0,0; 3,2; 1.011,9)
	3.000-5.000	3	0,8 (0,1; 0,2; 2,1)	98,9	0,00 (0,00; 0,00; 0,00)	20,1 (2,2; 6,9; 51,1)	20,4 (0,0; 4,8; 56,5)
	5.000+	60	3,0 (0,0; 0,0; 146,8)	98,6	0,00 (0,00; 0,00; 0,03)	183,1 (0,0; 0,3; 10.583,8)	352,8 (0,0; 0,0; 11.297,1)
Total	366	9,7 (0,0; 2,5; 146,8)	81,1	0,04 (0,00; 0,00; 1,21)	51,0 (0,0; 2,7; 10.583,8)	77,2 (0,0; 1,6; 11.297,1)	
Pérdida	25-50	201	7,3 (0,0; 5,0; 60,3)	78,7	0,03 (0,00; 0,00; 0,66)	1,6 (0,0; 0,5; 22,6)	1,8 (0,0; 0,4; 23,9)
	50-75	84	11,3 (0,0; 6,5; 71,4)	83,5	0,04 (0,00; 0,00; 0,68)	4,0 (0,0; 2,2; 43,4)	4,0 (0,0; 0,6; 33,8)
	75-100	38	22,5 (0,0; 6,3; 115,9)	80,5	0,09 (0,00; 0,01; 0,50)	15,6 (0,0; 2,3; 116,5)	6,5 (0,0; 2,4; 47,0)
	100-150	57	6,8 (0,0; 3,8; 41,5)	91,0	0,01 (0,00; 0,00; 0,20)	6,5 (0,0; 2,0; 55,6)	2,9 (0,0; 1,5; 16,4)
	150-200	21	8,5 (0,2; 2,1; 104,1)	83,8	0,02 (0,00; 0,00; 0,17)	11,0 (0,0; 3,0; 163,9)	3,6 (0,0; 0,6; 43,9)
	200-300	19	11,2 (0,4; 7,1; 43,4)	83,2	0,04 (0,00; 0,00; 0,42)	18,0 (0,0; 4,4; 121,4)	12,3 (0,0; 1,6; 79,3)
	300-400	14	15,4 (0,0; 0,9; 94,8)	82,1	0,01 (0,00; 0,00; 0,05)	35,5 (0,0; 0,3; 293,4)	21,8 (0,0; 2,4; 184,3)
	400-1.000	28	19,7 (0,0; 4,6; 167,4)	82,9	0,12 (0,00; 0,01; 1,26)	57,9 (0,0; 5,3; 466,3)	75,1 (0,0; 12,0; 1.442,1)
	1.000-3.000	35	3,2 (0,0; 0,4; 33,4)	94,5	0,01 (0,00; 0,00; 0,10)	21,3 (0,0; 1,1; 342,6)	28,5 (0,0; 4,7; 202,4)
	3.000-5.000	11	0,3 (0,0; 0,0; 2,6)	83,9	0,00 (0,00; 0,00; 0,00)	11,4 (0,0; 0,0; 117,9)	4,0 (0,0; 0,0; 24,6)
5.000+	40	0,5 (0,0; 0,0; 9,4)	99,6	0,00 (0,00; 0,00; 0,06)	8,1 (0,0; 0,6; 164,7)	50,9 (0,0; 0,1; 1.484,5)	
Total	548	9,0 (0,0; 3,7; 167,4)	84,4	0,03 (0,00; 0,00; 1,26)	10,1 (0,0; 1,2; 466,3)	12,6 (0,0; 1,3; 1.484,5)	
Todo	Total	914	9,3 (0,0; 3,2; 167,4)	83,2	0,03 (0,00; 0,00; 1,26)	26,4 (0,0; 1,5; 10.583,8)	38,5 (0,0; 1,4; 11.297,1)

* Consulte el cuadro 1 para ver las descripciones de los parámetros de la tabla.

Se realizó un estudio de reproducibilidad entre lotes para evaluar el impacto del lote de array, el lote de reactivos y el operador en la reproducibilidad del ensayo CytoScan Dx. Se evaluó un total de 47 muestras de ADNg (23 derivadas de sangre periférica y 24 derivadas de líneas celulares); 6 operadores, 3 lotes de reactivos y 3 lotes de array durante el estudio en un centro. Las muestras presentaban anomalías que, en conjunto, cubrían el 31,3 % del genoma. Cada muestra se analizó 10 veces durante el estudio, excepto una muestra de control que se analizó en cada lote y, por lo tanto, se analizó 24 veces. Los métodos de análisis de datos son los mismos que los que se utilizaron en el estudio de reproducibilidad de centro a centro. Los resultados de reproducibilidad observados en el estudio de reproducibilidad de lote a lote fueron similares a los resultados del estudio de centro a centro.

La reproducibilidad de las determinaciones de LOH se calculó en el estudio de centro a centro y se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Reproducibilidad de determinaciones de LOH en el estudio de centro a centro.

Rango de tamaños (Mb)	N.º de regiones de LOH	Tasa de determinación	Concordancia de réplicas por pares		PPA	
			Coincidencia parcial			
			50 %	80 %	50 %	80 %
3-4	228	84,6	90,0	82,4	93,5	83,9
4-5	38	97,9	95,4	81,0	96,3	81,6
5-10	68	96,7	91,5	84,9	93,4	86,6
>10	147	99,7	96,0	93,4	96,3	93,6
Total	481	91,9	92,4	86,0	94,6	87,4

Precisión analítica

Se evaluó la precisión de los resultados del ensayo CytoScan Dx comparando las CNV identificadas por el ensayo CytoScan Dx con los resultados obtenidos mediante métodos alternativos. Las CNV identificadas por el ensayo CytoScan Dx en 137 muestras se compararon con un método de secuenciación de alto rendimiento validado. De las 137 muestras del estudio de secuenciación, 132 fueron evaluables (tres de las cinco muestras omitidas se anotaron incorrectamente y las otras dos se hipersegmentaron [>40 segmentos], lo que indica ADN de mala calidad). Las muestras eran una combinación de líneas celulares de Coriell complementadas con muestras clínicas para incluir anomalías que cubrían la mayor parte del genoma que estaba disponible. Se identificó un total de 1.280 CNV en estas 132 muestras, que se compararon con los datos de secuenciación. Las CNV cubrían el 63,5 % del genoma y eran más prevalentes en regiones no teloméricas/no centroméricas que en regiones teloméricas/centroméricas (62,3 % frente a 37,7 %) y en regiones genéricas que no genéricas (79,1 % frente a 20,9 %). El 28,9 % de las CNV tenía un contenido alto en GC (>45 %). El criterio de concordancia entre las CNV identificadas mediante el ensayo CytoScan Dx y el método de secuenciación presentó una coincidencia parcial de ≥ 50 % en los marcadores y el mismo estado del número de copias (ganancia o pérdida) entre los dos métodos. Debido a la cantidad de CNV que no mostraron ganancia ni pérdida (es decir, estaban en estado neutral) mediante la secuenciación de alto rendimiento, se llevó a cabo otro método molecular validado en un número estadísticamente apropiado de CNV, y los resultados del ensayo CytoScan Dx se compararon con este método analítico compuesto (Tablas 16A-C). Este análisis de proporción demostró una mejora moderada en los resultados del 78,8 % (IC del 95 %, 76,4-80,9 %) al 88,7 % (IC del 95 %, 84,2-92,2 %). Los resultados de las Tablas 15A-E y 16A-C resumen la exactitud (% de concordancia entre el ensayo CytoScan Dx y el método de comparación) y el FPR (concordancia 1; consulte la nota al pie de las tablas para obtener más información) estratificado por el estado del número de copia, el tamaño o el rango del marcador y la región genómica.

Tabla 15A. Precisión del ensayo CytoScan Dx para todas las regiones de CNV estratificadas por ganancia/pérdida y tamaño (kb) en comparación con el método de secuenciación.

Ganancia/pérdida	Rango de CNV (kb)	Tamaño de la muestra (N)	Concordancia	% de concordancia (IC del 95 %)* a partir de la secuenciación	FPR** (IC del 95 %)* a partir de la secuenciación
Ganancia	50-75	49	39	79,6 % (66,4 %, 88,5 %)	20,4 % (11,5 %, 33,6 %)
	75-100	48	21	43,8 % (30,7 %, 57,7 %)	56,3 % (42,3 %, 69,3 %)
	100-150	133	95	71,4 % (63,2 %, 78,4 %)	28,6 % (21,6 %, 36,8 %)
	150-200	39	20	51,3 % (36,2 %, 66,1 %)	48,7 % (33,9 %, 63,8 %)
	200-300	56	38	67,9 % (54,8 %, 78,6 %)	32,1 % (21,4 %, 45,2 %)
	300-400	42	31	73,8 % (58,9 %, 84,7 %)	26,2 % (15,3 %, 41,1 %)
	400-1.000	123	67	54,5 % (45,7 %, 63,0 %)	45,5 % (37,0 %, 54,3 %)
	1.000+	83	82	98,8 % (93,5 %, 99,8 %)	1,2 % (0,2 %, 6,5 %)
	Total	573	393	68,6 % (64,7 %, 72,3 %)	31,4 % (27,7 %, 35,3 %)
Pérdida	25-50	157	117	74,5 % (67,2 %, 80,7 %)	25,5 % (19,3 %, 32,8 %)
	50-75	92	80	87,0 % (78,6 %, 92,4 %)	13,0 % (7,6 %, 21,4 %)
	75-100	42	36	85,7 % (72,2 %, 93,3 %)	14,3 % (6,7 %, 27,8 %)
	100-150	168	149	88,7 % (83,0 %, 92,6 %)	11,3 % (7,4 %, 17,0 %)
	150-200	26	24	92,3 % (75,9 %, 97,9 %)	7,7 % (2,1 %, 24,1 %)
	200-300	35	31	88,6 % (74,0 %, 95,5 %)	11,4 % (4,5 %, 26,0 %)
	300-400	26	22	84,6 % (66,5 %, 93,9 %)	15,4 % (6,1 %, 33,5 %)
	400-1.000	51	49	96,1 % (86,8 %, 98,9 %)	3,9 % (1,1 %, 13,2 %)
	1.000+	110	107	97,3 % (92,3 %, 99,1 %)	2,7 % (0,9 %, 7,7 %)
	Total	707	615	87,0 % (84,3 %, 89,3 %)	13,0 % (10,7 %, 15,7 %)
	Total		1.280	1.008	78,8 % (76,4 %, 80,9 %)

* IC del 95 % calculado mediante el método de puntuación de Wilson.

** FPR = Pr(secuenciación ≠ ganancia o pérdida | Ensayo CytoScan Dx = ganancia o pérdida) en este contexto es de concordancia 1 en lugar de la especificidad 1 convencional; es decir, FPR = concordancia 1, donde la concordancia se define como TP/(TP+FP), y la secuenciación se define como verdad. La concordancia también puede llamarse PPV

Tabla 15B. Precisión del ensayo CytoScan Dx para todas las regiones de CNV estratificadas por ganancia/pérdida y tamaño (marcadores) en comparación con el método de secuenciación.

Ganancia/pérdida	Rango de CNV (marcadores)	Tamaño de la muestra (N)	Concordancia	% de concordancia (IC del 95 %)* a partir de la secuenciación	FPR** (IC del 95 %)* a partir de la secuenciación
Ganancia	50-75	121	90	74,4 % (65,9 %, 81,3 %)	25,6 % (18,7 %, 34,1 %)
	75-100	70	36	51,4 % (40,0 %, 62,8 %)	48,6 % (37,2 %, 60,0 %)
	100-150	131	83	63,4 % (54,8 %, 71,1 %)	36,6 % (28,9 %, 45,2 %)
	150-200	69	43	62,3 % (50,5 %, 72,8 %)	37,7 % (27,2 %, 49,5 %)
	200-300	78	43	55,1 % (44,1 %, 65,7 %)	44,9 % (34,3 %, 55,9 %)
	300-400	16	13	81,3 % (57,0 %, 93,4 %)	18,8 % (6,6 %, 43,0 %)
	400-1.000	21	20	95,2 % (77,3 %, 99,2 %)	4,8 % (0,8 %, 22,7 %)
	1.000+	67	65	97,0 % (89,8 %, 99,2 %)	3,0 % (0,8 %, 10,2 %)
	Total	573	393	68,6 % (64,7 %, 72,3 %)	31,4 % (27,7 %, 35,3 %)
Pérdida	25-50	158	121	76,6 % (69,4 %, 82,5 %)	23,4 % (17,5 %, 30,6 %)
	50-75	115	104	90,4 % (83,7 %, 94,6 %)	9,6 % (5,4 %, 16,3 %)
	75-100	154	137	89,0 % (83,0 %, 93,0 %)	11,0 % (7,0 %, 17,0 %)
	100-150	58	51	87,9 % (77,1 %, 94,0 %)	12,1 % (6,0 %, 22,9 %)
	150-200	31	24	77,4 % (60,2 %, 88,6 %)	22,6 % (11,4 %, 39,8 %)
	200-300	31	22	71,0 % (53,4 %, 83,9 %)	29,0 % (16,1 %, 46,6 %)
	300-400	17	16	94,1 % (73,0 %, 99,0 %)	5,9 % (1,0 %, 27,0 %)
	400-1.000	39	36	92,3 % (79,7 %, 97,3 %)	7,7 % (2,7 %, 20,3 %)
	1.000+	104	104	100,0 % (96,4 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 3,6 %)
	Total	707	615	87,0 % (84,3 %, 89,3 %)	13,0 % (10,7 %, 15,7 %)
	Total		1.280	1.008	78,8 % (76,4 %, 80,9 %)

* IC del 95 % calculado mediante el método de puntuación de Wilson.

** FPR = Pr(secuenciación ≠ ganancia o pérdida | Ensayo CytoScan Dx = ganancia o pérdida) en este contexto es de concordancia 1 en lugar de la especificidad 1 convencional; es decir, FPR = concordancia 1, donde la concordancia se define como TP/(TP+FP), y la secuenciación se define como verdad. La concordancia también puede llamarse PPV.

Tabla 15C. Exactitud del ensayo CytoScan Dx para CNV en las regiones que excluyen las regiones hipervariables definidas por la empresa estratificadas por ganancia/pérdida y tamaño (kb) en comparación con el método de secuenciación.

Ganancia/pérdida	Rango de CNV (kb)	Tamaño de la muestra (N)	Concordancia	% de concordancia (IC del 95 %)* a partir de la secuenciación	FPR** (IC del 95 %)* a partir de la secuenciación
Ganancia	50-75	31	28	90,3 % (75,1 %, 96,7 %)	9,7 % (3,3 %, 24,9 %)
	75-100	24	17	70,8 % (50,8 %, 85,1 %)	29,2 % (14,9 %, 49,2 %)
	100-150	85	72	84,7 % (75,6 %, 90,8 %)	15,3 % (9,2 %, 24,4 %)
	150-200	28	20	71,4 % (52,9 %, 84,7 %)	28,6 % (15,3 %, 47,1 %)
	200-300	44	38	86,4 % (73,3 %, 93,6 %)	13,6 % (6,4 %, 26,7 %)
	300-400	35	31	88,6 % (74,0 %, 95,5 %)	11,4 % (4,5 %, 26,0 %)
	400-1.000	37	32	86,5 % (72,0 %, 94,1 %)	13,5 % (5,9 %, 28,0 %)
	1.000+	83	82	98,8 % (93,5 %, 99,8 %)	1,2 % (0,2 %, 6,5 %)
	Total	367	320	87,2 % (83,4 %, 90,2 %)	12,8 % (9,8 %, 16,6 %)
Pérdida	25-50	104	64	61,5 % (51,9 %, 70,3 %)	38,5 % (29,7 %, 48,1 %)
	50-75	34	23	67,6 % (50,8 %, 80,9 %)	32,4 % (19,1 %, 49,2 %)
	75-100	20	14	70,0 % (48,1 %, 85,5 %)	30,0 % (14,5 %, 51,9 %)
	100-150	67	55	82,1 % (71,3 %, 89,4 %)	17,9 % (10,6 %, 28,7 %)
	150-200	23	21	91,3 % (73,2 %, 97,6 %)	8,7 % (2,4 %, 26,8 %)
	200-300	25	23	92,0 % (75,0 %, 97,8 %)	8,0 % (2,2 %, 25,0 %)
	300-400	11	8	72,7 % (43,4 %, 90,3 %)	27,3 % (9,7 %, 56,6 %)
	400-1.000	35	33	94,3 % (81,4 %, 98,4 %)	5,7 % (1,6 %, 18,6 %)
	1.000+	110	107	97,3 % (92,3 %, 99,1 %)	2,7 % (0,9 %, 7,7 %)
	Total	429	348	81,1 % (77,1 %, 84,5 %)	18,9 % (15,5 %, 22,9 %)
Total		796	668	83,9 % (81,2 %, 86,3 %)	16,1 % (13,7 %, 18,8 %)

* IC del 95 % calculado mediante el método de puntuación de Wilson.

** FPR = Pr (secuenciación ≠ ganancia o pérdida | Ensayo CytoScan Dx = ganancia o pérdida) en este contexto es de concordancia 1 en lugar de la especificidad 1 convencional; es decir, FPR = concordancia 1, donde la concordancia se define como TP/(TP+FP), y la secuenciación se define como verdad. La concordancia también puede llamarse PPV.

Tabla 15D. Exactitud del ensayo CytoScan Dx para CNV en las regiones que excluyen las regiones hipervariables definidas por la empresa estratificadas por ganancia/pérdida y tamaño (marcador) en comparación con el método de secuenciación.

Ganancia/pérdida	Rango de CNV (marcadores)	Tamaño de la muestra (N)	Concordancia	% de concordancia (IC del 95 %)* a partir de la secuenciación	FPR** (IC del 95 %)* a partir de la secuenciación
Ganancia	50-75	76	57	75,0 % (64,2 %, 83,4 %)	25,0 % (16,6 %, 35,8 %)
	75-100	38	35	92,1 % (79,2 %, 97,3 %)	7,9 % (2,7 %, 20,8 %)
	100-150	56	46	82,1 % (70,2 %, 90,0 %)	17,9 % (10,0 %, 29,8 %)
	150-200	49	43	87,8 % (75,8 %, 94,3 %)	12,2 % (5,7 %, 24,2 %)
	200-300	46	41	89,1 % (77,0 %, 95,3 %)	10,9 % (4,7 %, 23,0 %)
	300-400	14	13	92,9 % (68,5 %, 98,7 %)	7,1 % (1,3 %, 31,5 %)
	400-1.000	21	20	95,2 % (77,3 %, 99,2 %)	4,8 % (0,8 %, 22,7 %)
	1.000+	67	65	97,0 % (89,8 %, 99,2 %)	3,0 % (0,8 %, 10,2 %)
	Total	367	320	87,2 % (83,4 %, 90,2 %)	12,8 % (9,8 %, 16,6 %)
Pérdida	25-50	104	68	65,4 % (55,8 %, 73,8 %)	34,6 % (26,2 %, 44,2 %)
	50-75	47	36	76,6 % (62,8 %, 86,4 %)	23,4 % (13,6 %, 37,2 %)
	75-100	50	34	68,0 % (54,2 %, 79,2 %)	32,0 % (20,8 %, 45,8 %)
	100-150	41	36	87,8 % (74,5 %, 94,7 %)	12,2 % (5,3 %, 25,5 %)
	150-200	24	21	87,5 % (69,0 %, 95,7 %)	12,5 % (4,3 %, 31,0 %)
	200-300	25	18	72,0 % (52,4 %, 85,7 %)	28,0 % (14,3 %, 47,6 %)
	300-400	13	12	92,3 % (66,7 %, 98,6 %)	7,7 % (1,4 %, 33,3 %)
	400-1.000	21	19	90,5 % (71,1 %, 97,3 %)	9,5 % (2,7 %, 28,9 %)
	1.000+	104	104	100,0 % (96,4 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 3,6 %)
	Total	429	348	81,1 % (77,1 %, 84,5 %)	18,9 % (15,5 %, 22,9 %)
Total		796	668	83,9 % (81,2 %, 86,3 %)	16,1 % (13,7 %, 18,8 %)

* IC del 95 % calculado mediante el método de puntuación de Wilson.

** FPR = Pr (secuenciación ≠ ganancia o pérdida | Ensayo CytoScan Dx = ganancia o pérdida) en este contexto es de concordancia 1 en lugar de la especificidad 1 convencional; es decir, FPR = concordancia 1, donde la concordancia se define como TP/(TP+FP), y la secuenciación se define como verdad. La concordancia también puede llamarse PPV.

Tabla 15E. Exactitud del ensayo **CytoScan Dx** para CNV en regiones hipervariables definidas por la empresa en comparación con el método de secuenciación.

Región	Tamaño de la muestra (N)	Concordancia	% de concordancia (IC del 95 %)* a partir de la secuenciación	FPR (IC del 95 %)* a partir de la secuenciación
1q44	43	43	100,0 % (91,8 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 8,2 %)
5q35.3	48	48	100,0 % (92,6 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 7,4 %)
7p14.1	3	3	100 % (43,8 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 56,2 %)
8p11.22	75	72	96,0 % (88,9 %, 98,6 %)	4,0 % (1,4 %, 11,1 %)
11q11	85	58	68,2 (57,7 %, 77,2 %)	31,8 % (22,8 %, 42,3 %)
14q11.2	27	19	70,4 % (51,5 %, 84,1 %)	29,6 % (15,9 %, 48,5 %)
14q32.3	118	24	20,3 % (14,1 %, 28,5 %)	79,7 % (71,5 %, 85,9 %)
17q21.3	71	70	98,6 % (92,4 %, 99,8 %)	1,4 % (0,2 %, 7,6 %)
22q11.2	14	3	21,4 % (7,6 %, 47,6 %)	78,6 % (52,4 %, 92,4 %)
Total	484	340	70,2 % (66,0 %, 74,1 %)	29,8 % (25,9 %, 34,0 %)

* IC del 95 % calculado mediante el método de puntuación de Wilson.

** FPR = Pr (secuenciación ≠ ganancia o pérdida | Ensayo CytoScan Dx = ganancia o pérdida) en este contexto es de concordancia 1 en lugar de la especificidad 1 convencional; es decir, FPR = concordancia 1, donde la concordancia se define como TP/(TP+FP), y la secuenciación se define como verdad. La concordancia también puede llamarse PPV.

Tabla 16A. Exactitud del ensayo **CytoScan Dx** para regiones de CNV que excluyen las regiones hipervariables definidas por la empresa estratificadas por ganancia/pérdida y tamaño (kb) en comparación con un método compuesto.

Ganancia/pérdida	Rango de CNV (kb)	Tamaño de la muestra (N)	% de concordancia (IC del 95 %)* a partir de métodos compuestos	FPR** (IC del 95 %)* a partir de métodos compuestos
Ganancia	50-75	31	93,5 % (78,2 %, 94,6 %)	6,5 % (5,4 %, 21,8 %)
	75-100	24	83,3 % (68,1 %, 86,4 %)	16,7 % (13,6 %, 31,9 %)
	100-150	85	55,5 % (29,1 %, 80,4 %)	44,5 % (19,6 %, 70,9 %)
	150-200	28	76,0 % (62,3 %, 80,6 %)	24,0 % (19,4 %, 37,7 %)
	200-300	45	88,9 % (72,0 %, 91,0 %)	11,1 % (9,0 %, 28,0 %)
	300-400	35	71,4 % (31,2 %, 100,0 %)	28,6 % (0,0 %, 68,8 %)
	400-1.000	37	94,6 % (71,5 %, 95,9 %)	5,4 % (4,1 %, 28,5 %)
	1.000+	83	88,6 % (62,5 %, 96,7 %)	11,4 % (3,3 %, 37,5 %)
	Total	368	79,1 % (69,7 %, 86,7 %)	20,9 % (13,3 %, 30,3 %)
Pérdida	25-50	103	91,6 % (88,3 %, 92,4 %)	8,4 % (7,6 %, 11,7 %)
	50-75	34	100,0 % (89,8 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 10,2 %)
	75-100	20	95,0 % (79,7 %, 95,8 %)	5,0 % (4,2 %, 20,3 %)
	100-150	67	95,1 % (83,7 %, 95,8 %)	4,9 % (4,2 %, 16,3 %)
	150-200	23	100,0 % (67,9 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 32,1 %)
	200-300	25	100,0 % (67,3 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 32,7 %)
	300-400	11	100,0 % (77,5 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 22,5 %)
	400-1.000	35	100,0 % (65,3 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 34,7 %)
	1.000+	110	100,0 % (76,1 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 23,9 %)
	Total	428	97,0 % (95,1 %, 97,1 %)	3,0 % (2,9 %, 4,9 %)
Todo		796	88,7 % (84,2 %, 92,2 %)	11,3 % (7,8 %, 15,8 %)

* IC del 95 % calculado mediante el método de puntuación de Wilson.

** FPR = Pr (compuesto ≠ ganancia o pérdida | Ensayo CytoScan Dx = ganancia o pérdida) en este contexto es de concordancia 1 en lugar de la especificidad 1 convencional, es decir, FPR = concordancia 1, donde la concordancia se define como TP/(TP+FP), y la secuenciación se define como verdad. La concordancia también puede llamarse PPV.

*** La concordancia con los métodos compuestos puede verse afectada negativamente por la densidad variable de marcadores en el array CytoScan Dx.

Tabla 16B. Exactitud del ensayo CytoScan Dx para regiones de CNV que excluyen las regiones hipervariables definidas por la empresa estratificadas por ganancia/pérdida y tamaño (marcadores) en comparación con un método compuesto.

Ganancia/pérdida	Rango de CNV (marcadores)	Tamaño de la muestra (N)	% de concordancia (IC del 95 %)* a partir de métodos compuestos	FPR** (IC del 95 %)* a partir de métodos compuestos
Ganancia	50-75	76	73,6 % (67,4 %, 75,8 %)	26,4 % (24,2 %, 32,6 %)
	75-100	38	78,3 % (61,0 %, 83,1 %)	21,7 % (16,9 %, 39,0 %)
	100-150	57	72,4 % (60,9 %, 76,8 %)	27,6 % (23,2 %, 39,1 %)
	150-200	49	72,4 % (57,0 %, 78,3 %)	27,6 % (21,7 %, 43,0 %)
	200-300	46	74,7 % (61,6 %, 79,1 %)	25,3 % (20,9 %, 38,4 %)
	300-400	14	79,5 % (17,4 %, 95,5 %)	20,5 % (4,5 %, 82,6 %)
	400-1.000	21	95,2 % (60,1 %, 97,0 %)	4,8 % (3,0 %, 39,9 %)
	1.000+	67	94,0 % (68,7 %, 95,6 %)	6,0 % (4,4 %, 31,3 %)
	Total	368	79,1 % (76,6 %, 79,7 %)	20,9 % (20,3 %, 23,4 %)
Pérdida	25-50	104	90,9 % (87,8 %, 91,2 %)	9,1 % (8,8 %, 12,2 %)
	50-75	47	95,7 % (83,7 %, 96,3 %)	4,3 % (3,7 %, 16,3 %)
	75-100	50	97,6 % (90,6 %, 97,7 %)	2,4 % (2,3 %, 9,4 %)
	100-150	41	100,0 % (72,1 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 27,9 %)
	150-200	23	100,0 % (76,2 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 23,8 %)
	200-300	25	98,9 % (77,7 %, 99,1 %)	1,1 % (0,9 %, 22,3 %)
	300-400	13	100,0 % (84,4 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 15,6 %)
	400-1.000	21	100,0 % (36,5 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 63,5 %)
	1.000+	104	100,0 % (69,3 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 30,7 %)
Total	428	97,0 % (95,2 %, 97,0 %)	3,0 % (3,0 %, 4,8 %)	
Todo		796	88,7 % (87,7 %, 88,8 %)	11,3 % (11,2 %, 12,3 %)

* IC del 95 % calculado mediante el método de puntuación de Wilson.

** FPR = Pr (compuesto#ganancia o pérdida | Ensayo CytoScan Dx = ganancia o pérdida) en este contexto es de concordancia 1 en lugar de la especificidad 1 convencional, es decir, FPR = concordancia 1, donde la concordancia se define como TP/(TP+FP), y la secuenciación se define como verdad. La concordancia también puede llamarse PPV.

*** La concordancia con los métodos compuestos puede verse afectada negativamente por la densidad variable de marcadores en el array CytoScan Dx.

Tabla 16C. Exactitud del ensayo CytoScan Dx para CNV en regiones hipervariables definidas por la empresa en comparación con un método compuesto.

Región	Tamaño de la muestra (N)	% de concordancia (IC del 95 %)* a partir de métodos compuestos	FPR** (IC del 95 %)* a partir de métodos compuestos
1q44	43	100 % (59,6 %, 100 %)	0,0 % (0,0 %, 40,4 %)
5q35.3	48	100 % (59,2 %, 100 %)	0,0 % (0,0 %, 40,8 %)
7p14.1	3	100 % (61 %, 100 %)	0,0 % (0,0 %, 39,0 %)
8p11.22	75	88 % (59,6 %, 99 %)	12,0 % (1,0 %, 40,4 %)
11q11	85	100 % (72,4 %, 100 %)	0,0 % (0,0 %, 27,6 %)
14q11.2	27	90,1 % (58,2 %, 95,4 %)	9,9 % (4,6 %, 41,8 %)
14q32.33	118	14,7 % (4,9 %, 39,3 %)	85,3 % (60,7 %, 95,1 %)
17q21.31	71	100,0 % (70,1 %, 100,0 %)	0,0 % (0,0 %, 29,9 %)
22q11.22	14	21,4 % (15,7 %, 42,5 %)	78,6 % (57,5 %, 84,3 %)
Todo	484	74,5 % (67,7 %, 79,0 %)	25,5 % (21,0 %, 32,3 %)

* IC del 95 % calculado mediante el método de puntuación de Wilson para kb. Se utilizó el método de Wilson modificado: se ajustaron los efectos del muestreo ponderado y estratificado y el muestreo de poblaciones finitas para calcular el IC del 95 % para los marcadores.

** FPR = Pr (compuesto#ganancia o pérdida | Ensayo CytoScan Dx = ganancia o pérdida) en este contexto es de concordancia 1 en lugar de la especificidad 1 convencional, es decir, FPR = concordancia 1, donde la concordancia se define como TP/(TP+FP), y PCRc se define como verdad. La concordancia también puede llamarse PPV.

*** La concordancia con los métodos compuestos puede verse afectada negativamente por la densidad variable de marcadores en el array CytoScan Dx.

Porcentaje de concordancia positiva para anomalías de mayor tamaño en comparación con el cariotipo histórico y los resultados de FISH

Para las 132 muestras, se detectaron 163 CNV con cariotipo histórico o FISH, que representaban principalmente CNV de gran tamaño (media 25,1 MB, mediana 11,2 MB, rango 1,8-175,9 MB). Se analizaron manualmente el cariotipo ISCN o el diagnóstico histórico para identificar la dirección del número de copia e iniciar y finalizar citobandas para las anomalías. Se obtuvieron las ubicaciones del mapa genómico para cada citobanda a partir del Explorador del genoma UCSC mediante el constructo hg19. Debido a la variabilidad de la interpretación humana y la similitud de aparición de citobandas de diferentes cromosomas en casos de translocaciones, la localización de las citobandas no es muy exacta, por lo que las regiones identificadas por cariotipo y FISH se expandieron en una citobanda en cada extremo. Estas citobandas se convirtieron en coordenadas de pares de bases genómicas y se compararon las ubicaciones de CNV del ensayo CytoScan Dx con estos resultados históricos de cariotipo o FISH. Se definió la concordancia como el mismo número de copia, estado, ganancia o pérdida, con cualquier grado de coincidencia parcial. El porcentaje

de concordancia positiva se define como la proporción de CNV identificadas por cariotipo o FISH (ganancia/pérdida) que tienen la misma determinación de estado de CNV en el ensayo CytoScan Dx (ganancia/pérdida). El porcentaje de concordancia positiva entre el ensayo CytoScan Dx y la RPC fue del 91,4 % (149/163; método de Wilson, IC del 95 %, 86,1 %-94,8 %). De las 14 anomalías no detectadas, cuatro eran translocaciones equilibradas que no se detectan mediante el ensayo CytoScan Dx, 3 CNV estaban fuera de las regiones de los marcadores del ensayo CytoScan Dx (dos al final del cromosoma Y y una en el brazo p acrocéntrico del cromosoma 22), y un mosaico de bajo nivel que estaba por debajo del límite de detección establecido para el ensayo CytoScan Dx.

Concordancia de los criterios de valoración

Se calculó la distancia entre los criterios de valoración para las CNV detectadas tanto en la secuenciación como en el ensayo CytoScan Dx. Se definió la concordancia entre el criterio de valoración del ensayo CytoScan Dx y de la secuenciación utilizando dos criterios: (1) el mismo estado de CNV (ganancia o pérdida) tanto en CytoScan Dx como en la secuenciación; (2) los criterios de valoración eran de ≤12 marcadores para las pérdidas y ≤25 marcadores para las ganancias. En este análisis, se excluyeron las regiones del genoma hipervariables definidas por la empresa y solo se analizaron las CNV con las mismas determinaciones de estado de CNV en el ensayo CytoScan Dx y la secuenciación para la concordancia entre criterios de valoración. Se incluyó un total de 1.367 criterios de valoración en el análisis. Para el criterio de valoración izquierdo (inicial), la distancia se calculó como CytoScan Dx Assay_start_probenum – sequencing_start_probenum, mientras que para el criterio de valoración derecho (final), la distancia se calculó como sequencing_end_probenum – CytoScan Dx Assay_end_probenum. Los valores negativos indican que el criterio de valoración de la CNV está más alejado del centro de la CNV en el ensayo CytoScan Dx en comparación con la secuenciación, mientras que los valores positivos indican que el criterio de valoración de la CNV está más cerca del centro de la CNV en el ensayo CytoScan Dx en comparación con la secuenciación. La tasa de concordancia del criterio de valoración de CNV determinado por el ensayo CytoScan Dx y del criterio de valoración determinado por la secuenciación se evaluó utilizando los criterios de ≤12 marcadores para segmentos de pérdida y ≤25 marcadores para segmentos de ganancia.

Tabla 17. Concordancia de los criterios de valoración utilizando los criterios de ≤12 marcadores para segmentos de pérdida y ≤25 marcadores para segmentos de ganancia (excluyendo las CNV dentro de las regiones hipervariables del genoma).

Ganancia/pérdida	Tamaño de CNV (marcadores)	Criterios de valoración, N	Concordancia de los criterios de valoración, N	% de concordancia de los criterios de valoración (IC del 95 %)
Ganancia	50-75	104	104	100,0 % (96,4 %, 100,0 %)
	75-100	60	60	100,0 % (94,0 %, 100,0 %)
	100-150	73	71	97,3 % (92,4 %, 97,4 %)
	150-200	77	71	92,2 % (87,7 %, 97,7 %)
	200-300	86	76	88,4 % (84,5 %, 89,0 %)
	300-400	22	20	90,9 % (77,1 %, 92,6 %)
	400-1.000	42	38	90,5 % (82,7 %, 91,5 %)
	1.000+	128	121	94,5 % (91,7 %, 94,7 %)
	Total	592	561	94,8 % (94,1 %, 94,8 %)
Pérdida	25-50	206	206	100,0 % (98,2 %, 100,0 %)
	50-75	84	79	94,0 % (89,9 %, 94,4 %)
	75-100	80	73	91,3 % (87,0 %, 91,7 %)
	100-150	68	68	100,0 % (94,7 %, 100,0 %)
	150-200	34	33	97,1 % (87,1 %, 97,4 %)
	200-300	38	33	86,8 % (78,6 %, 88,3 %)
	300-400	28	25	89,3 % (78,2 %, 90,9 %)
	400-1.000	34	24	70,6 % (62,9 %, 74,1 %)
	1.000+	203	175	86,2 % (84,5 %, 86,5 %)
		Total	775	716
Todo		1.367	1.277	93,4 % (93,2 %, 93,4 %)

Además, se calculó la concordancia exacta a nivel del marcador para los 1.277 criterios de valoración concordantes. La Figura 1 muestra la distribución de la diferencia en los marcadores entre el criterio de valoración de secuenciación y el del ensayo Cytoscan Dx. El eje Y representa el número de criterios de valoración de CNV con la diferencia entre criterios de valoración indicada (eje x).

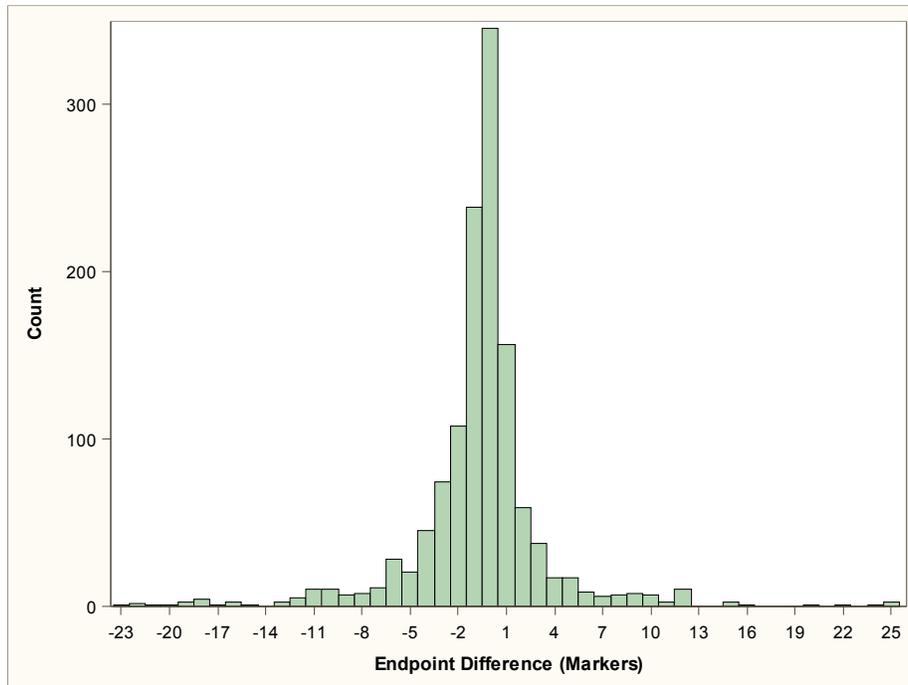


Figura 1. Diferencia entre criterios de valoración en los marcadores entre la secuenciación y el ensayo CytoScan Dx para CNV que cumplieron con los criterios.

Los valores negativos indican que el criterio de valoración determinado por el ensayo CytoScan Dx está más alejado del centro de la CNV que el criterio de valoración determinado por secuenciación; los valores positivos indican que el criterio de valoración determinado por el ensayo CytoScan Dx está más cerca del centro de la CNV que el criterio de valoración determinado por secuenciación. El recuento indica el número de criterios de valoración de CNV con la distancia entre criterios de valoración indicada en el eje x.

Tasa de negativos auténticos: Dado que no es posible evaluar la ausencia de CNV en todo el genoma, mediante el ensayo CytoScan Dx se realizó una secuenciación de alto rendimiento en 268 regiones cuyo número de copias era neutro. Todas las 268 (100,0 %) regiones tenían un número de copias neutro por secuenciación de alto rendimiento. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esto no proporciona la tasa de negativos auténticos completa, puesto que la secuenciación devolvió resultados neutros de números de copias falsos.

Regiones de LOH: Se determinó la precisión de las regiones de LOH comparando los datos derivados del ensayo CytoScan Dx con las determinaciones de LOH de los datos de secuencia de alto rendimiento ortogonal. Se compararon los datos de 45 arrays CytoScan Dx y los datos de secuenciación de alto rendimiento de 8 muestras de ADNg. El PPA entre el ensayo CytoScan Dx y la secuenciación fue 159/159 (100 %, IC del 95 % 97,5 %-100,0 %) para regiones de LOH de 3 MB y de mayor tamaño. Además, las determinaciones de LOH del ensayo CytoScan Dx se compararon con una tabla publicada de regiones de LOH derivadas de los genotipos de muestra de HapMap publicados por Gibson et al [13]. El manuscrito señaló la presencia de 1.393 regiones de LOH >1 MB de longitud en 209 pacientes de HapMap y proporcionó detalles sobre 20 de estas regiones, con un tamaño de 5 MB como mínimo. El ensayo CytoScan Dx identificó las 20 (100 %) regiones específicamente descritas por Gibson et al. En total, CytoScan identificó 42 regiones de LOH como mínimo de 5 MB, y 79 regiones de LOH de como mínimo 3 MB en dichas muestras.

Rendimiento de las CNV notificadas en el rango inferior del ensayo

Se evaluó el rendimiento de las CNV notificadas en el rango inferior del ensayo. El tamaño mínimo y el número de marcador de las CNV notificadas están dictados por la configuración del filtro, que está establecido en 25 kb y 25 marcadores para pérdidas del número de copias y 50 kb y 50 marcadores para ganancias del número de copias. Las CNV incluidas en este estudio incluyeron 50-75 marcadores o kb para las ganancias y 25-50 marcadores o kb para las pérdidas. La reproducibilidad de la configuración del filtro se resume en las Tablas 18A-B y la exactitud analítica se resume en la Tabla 19.

Tabla 18A. Concordancia de réplicas por pares y porcentaje de concordancia positiva para las CNV cerca de la configuración del filtro.*

Ganancia/pérdida	Región	Rango de CNV	N	Tasa de determinación	Concordancia de réplicas por pares		PPA	
					Coincidencia parcial			
					50 %	80 %	50 %	80 %
Ganancia	Todo	Marcador	230	49,7	70,8	68,7	72,7	68,7
		kb	99	50,4	71,4	67,2	70,4	62,1
	No HV**	Marcador	430	48,8	79,5	76,4	75,4	68,0
		kb	351	53,7	78,8	73,9	78,5	68,8
Pérdida	Todo	Marcador	166	45,4	75,1	73,6	74,7	71,6
		kb	79	49,5	75,4	73,4	74,2	70,1
	No HV	Marcador	387	49,8	81,0	78,1	77,4	70,6
		kb	286	54,3	81,0	77,2	80,9	73,4

* Consulte la tabla 1 para ver las descripciones de los parámetros de la tabla.

** CNV situadas fuera de las regiones hipervariables definidas por la empresa.

Tabla 18B. Reproducibilidad de longitud y criterios de valoración para las CNV cerca de la configuración del filtro.*

Ganancia/pérdida	Región	Categoría de tamaño*	N	% de CV de la longitud de CNV	% de coincidencia parcial promedio	% de la mediana de la desviación absoluta del criterio de valoración	DE izquierda del criterio de valoración	DE derecha del criterio de valoración
				Media (mín., mediana, máx.)		Media (mín., mediana, máx.)		
Ganancia	Todo	Marcador	157	5,1 (0,0; 4,1; 30,1)	68,5	0,03 (0,00; 0,01; 0,22)	1,8 (0,0; 1,2; 12,5)	2,2 (0,0; 1,6; 11,3)
		kb	67	9,1 (0,0; 3,9; 54,8)	69,6	0,04 (0,00; 0,00; 0,37)	5,1 (0,0; 0,9; 40,2)	2,9 (0,0; 1,1; 14,0)
	No HV**	Marcador	97	4,3 (0,0; 2,6; 30,1)	73,1	0,03 (0,00; 0,02; 0,22)	1,9 (0,0; 1,4; 12,5)	1,5 (0,0; 1,0; 11,3)
		kb	48	6,2 (0,0; 2,0; 54,8)	74,2	0,01 (0,00; 0,00; 0,18)	3,2 (0,0; 0,4; 40,2)	1,6 (0,0; 0,0; 8,4)
Pérdida	Todo	Marcador	282	6,9 (0,0; 5,4; 63,7)	77,3	0,04 (0,00; 0,02; 0,48)	1,4 (0,0; 1,0; 18,4)	1,8 (0,0; 0,9; 26,8)
		kb	252	9,5 (0,0; 6,6; 60,3)	76,3	0,04 (0,00; 0,00; 0,66)	2,0 (0,0; 0,1; 22,9)	2,8 (0,0; 1,3; 24,3)
	No HV	Marcador	250	6,3 (0,0; 4,9; 63,7)	78,8	0,03 (0,00; 0,02; 0,48)	1,5 (0,0; 1,1; 18,4)	1,5 (0,0; 0,8; 26,8)
		kb	201	7,3 (0,0; 5,0; 60,3)	78,7	0,03 (0,00; 0,00; 0,66)	1,6 (0,0; 0,5; 22,6)	1,8 (0,0; 0,4; 23,9)

* Consulte la tabla 1 para ver las descripciones de los parámetros de la tabla.

** CNV situadas fuera de las regiones hipervariables definidas por la empresa.

Tabla 19. Precisión analítica para las CNV cerca de la configuración del filtro.

Ganancia/pérdida	Región	Categoría de tamaño	Método de comparación	N	% de concordancia (IC del 95 %)**	FPR*** (IC del 95 %)**
Ganancia	Todo	Marcador	Secuenciación	121	74,4 % (65,9 %, 81,3 %)	25,6 % (18,7 %, 34,1 %)
		Kb	Secuenciación	49	79,6 % (66,4 %, 88,5 %)	20,4 % (11,5 %, 33,6 %)
	No HV*	Marcador	Secuenciación	76	75,0 % (64,2 %, 83,4 %)	25,0 % (16,6 %, 35,8 %)
		Marcador	Compuesto	76	73,6 % (67,4 %, 75,8 %)	26,4 % (24,2 %, 32,6 %)
		Kb	Secuenciación	31	90,3 % (75,1 %, 96,7 %)	9,7 % (3,3 %, 24,9 %)
		Kb	Compuesto	31	93,5 % (78,2 %, 94,6 %)	6,5 % (5,4 %, 21,8 %)
Pérdida	Todo	Marcador	Secuenciación	158	76,6 % (69,4 %, 82,5 %)	23,4 % (17,5 %, 30,6 %)
		Kb	Secuenciación	157	74,5 % (67,2 %, 80,7 %)	25,5 % (19,3 %, 32,8 %)
	No HV*	Marcador	Secuenciación	104	65,4 % (55,8 %, 73,8 %)	34,6 % (26,2 %, 44,2 %)
		Marcador	Compuesto	103	90,9 % (87,8 %, 91,2 %)	9,1 % (8,8 %, 12,2 %)
		Kb	Secuenciación	104	61,5 % (51,9 %, 70,3 %)	38,5 % (29,7 %, 48,1 %)
		Kb	Compuesto	103	91,6 % (88,3 %, 92,4 %)	8,4 % (7,6 %, 11,7 %)

* CNV situadas fuera de las regiones hipervariables definidas por la empresa.

** IC del 95 % calculado mediante el método de puntuación de Wilson. Se utilizó el método de Wilson modificado: se ajustaron los efectos del muestreo ponderado y estratificado y el muestreo de poblaciones finitas para calcular el IC del 95 % para los marcadores.

*** FPR = Pr (compuesto#ganancia o pérdida | Ensayo CytoScan Dx = ganancia o pérdida) en este contexto es de concordancia 1 en lugar de la especificidad 1 convencional; es decir, FPR = concordancia 1, donde la concordancia se define como TP/(TP+FP), y la secuenciación se define como verdad. La concordancia también puede llamarse PPV.

La configuración del filtro para regiones de pérdida de heterocigosis (LOH) es de 3 MB. La reproducibilidad de la determinación de LOH de 3-4 MB de longitud es del 91,9 %, medida por la tasa de determinación, y la concordancia con el genotipo de secuenciación de alto rendimiento es del 100,0 % para las regiones de LOH de 3-5 MB de longitud.

Límite de detección-entrada de ADN

En las instrucciones del ensayo se indica que deben usarse 250 ng de ADNg. Para determinar la menor cantidad de ADNg que puede usarse en el paso de digestión inicial del ensayo CytoScan Dx, se analizaron 6 niveles: 300 ng, 250 ng (obligatorio), 50 ng, 10 ng, 2 ng y 1 ng. El límite de detección determinado es de 10 ng.

Límite de detección-mosaicismo

Se realizó un estudio en el que se examinaron muestras mezcladas a varios niveles de valoración para determinar el límite en el cual el ensayo CytoScan Dx podía identificar mosaicismos para las ganancias o pérdidas de copias. En un total de 18 regiones genómicas, ocho muestras, cuatro masculinas y cuatro femeninas, cada una con translocación desequilibrada, mostraron 16 regiones autosómicas (8 ganancias y 8 pérdidas) con cambios conocidos en el número de copias más los cromosomas X e Y completos. Se mezclaron cuatro pares de muestras a 12 niveles de mezcla diferentes: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 70, 80, 90, 95, y 100 %, para generar muestras representativas de niveles específicos de mosaicismo. La visualización de ChAS Dx demostró que los eventos en mosaico se podían ver al examinar los datos. Se observó que las cantidades de señal (señal suave, ratio log2 ponderado y ratio log2) respondían linealmente en las condiciones de cambio del número de copias en mosaico. En las 18 regiones de todos los niveles de mezcla, se realizó un análisis ROC de la clasificación de regiones en mosaico y no en mosaico. Se establecieron curvas ROC para cada región de CNV mediante los valores de valoración utilizando el ratio log2, el ratio ponderado log2 y los datos de señal uniforme. Se calculó el AUC (área bajo la curva) para cada curva ROC.

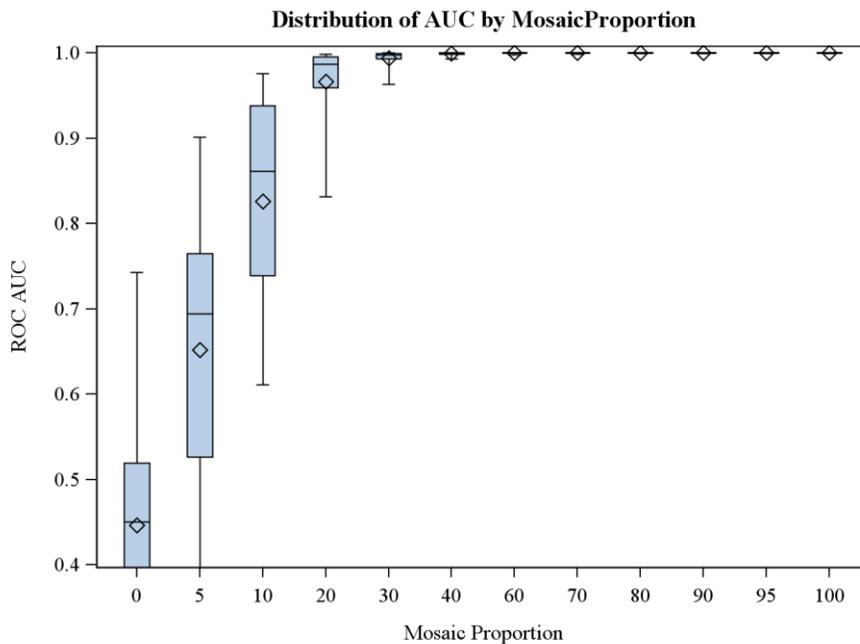


Figura 2. Diagramas de caja de valores ROC-AUC por proporción de mosaicismo.

Cada diagrama de caja representa los valores mínimos y máximos (extremos de los bigotes), mediana (línea horizontal), percentiles 25 y 75 (límites de la caja) y media (diamante). El AUC es equivalente a la probabilidad de que un marcador positivo elegido aleatoriamente sea más alto que una instancia negativa elegida aleatoriamente. La Figura 2 muestra un diagrama de caja de los valores ROC-AUC por proporción de mosaicismo para datos de señal uniforme. Con un 20 % de mosaicismo, la media y la mediana de AUC es de 0,97 y 0,99, respectivamente, lo que indica que se puede detectar un 20 % de mosaicismo con un 97 % de precisión.

Especificidad analítica

Contaminación cruzada

La sensibilidad a la contaminación cruzada se evaluó en condiciones de simulación de contaminación cruzada utilizando 8 muestras de ADNg, mezcladas en 4 pares a 12 velocidades diferentes antes de la etapa de hibridación. Los criterios de aceptación preespecificados fueron que el control de calidad de polimorfismos de nucleótido único (SNPQC) no debería caer por debajo del límite de aceptación estándar (SNPQC ≥12) con aproximadamente un 20 % de contaminación. Los valores de SNPQC ≥12 indican la ausencia de contaminación cruzada sustancial.

Contaminación cruzada

Para establecer que el ensayo CytoScan Dx reduce al mínimo el riesgo de obtener resultados falsos positivos derivados de la contaminación cruzada, se realizó un estudio analítico de varios días. Para determinar cualquier posible efecto de contaminación cruzada debido al ADNg, se usó una secuencia de una muestra normal seguida de tres muestras anómalas sucesivas (con las mismas anomalías) y después otro análisis de la misma muestra normal. Estos 5 análisis secuenciales se realizaron en un orden predefinido en 12 módulos de 3 estaciones de fluidos. Los criterios preestablecidos para establecer la ausencia de contaminación cruzada fueron comparar los valores métricos de rendimiento del array y la determinación del estado del número de copias en un conjunto de anomalías predefinidas entre el primer y el quinto análisis. No se produjeron diferencias significativas al determinar el estado del número de copias (estadística de los rangos con signo de Wilcoxon (S) = 0,5, valor p = 1,00) o métricas de CC del array (estadística de los rangos con signo de Wilcoxon, p >0,05) entre el primer y el quinto análisis, lo que sugiere que las fuentes potenciales, como la estación fluidica, no contaminan las muestras de ADNg anómalas.

Sustancias interferentes

Se evaluó la interferencia utilizando anomalías simuladas (es decir, sangre desleucocitada enriquecida con células que contenían anomalías conocidas) o muestras de sangre normales enriquecidas con bilirrubina conjugada y no conjugada, triglicéridos y hemoglobina. No se observó ninguna interferencia con las sustancias analizadas.

Características de rendimiento clínico

Se realizó un estudio clínico prospectivo y retrospectivo para clasificar las características del rendimiento clínico del ensayo CytoScan Dx en comparación con la asistencia sanitaria rutinaria en un entorno prospectivo y para notificar la tasa de detección de patógenos (rendimiento diagnóstico potencial). Se analizaron 960 muestras de ADNg de pacientes con RD/DI remitidos a tres laboratorios clínicos desde julio de 2009 hasta junio de 2012 para realizar pruebas cromosómicas de rutina. A partir de cariotipos, FISH, microarrays (no pertenecientes a Applied Biosystems) u otras técnicas (llamadas colectivamente asistencia sanitaria rutinaria, RPC), un citogenético asignó a todas las muestras y regiones de CNV una de las siguientes interpretaciones clínicas de laboratorio: benigna, patógena o variante de trascendencia clínica incierta (VOUS). Las muestras se analizaron en el ensayo CytoScan Dx y las interpretó un citogenético independiente (Tabla 20). En el nivel de las muestras, el porcentaje de concordancia positiva (PPA), definido como la proporción de muestras cuya asistencia sanitaria rutinaria está clasificada como patógena según los resultados del ensayo CytoScan Dx, es 105/128 = 82,0 % (IC del 95 %, 74,5-87,7 %). De 23 muestras clasificadas como patógenas en la RPC pero no en los resultados del ensayo CytoScan Dx, gracias a CytoScan el citogenético determinó que 22 muestras eran VOUS y una era benigna. En estas 23 muestras, la RPC identificó 49 CNV, de las cuales el ensayo CytoScan Dx identificó 45; por lo tanto, 45/49 CNV (91,8 %) que no concordaban en el nivel de determinación clínica sí lo hacían en el nivel analítico.

Tabla 20. Comparación de la clasificación de muestras entre la RPC y el ensayo CytoScan Dx en el estudio prospectivo.

Interpretación del citogenético del resultado del ensayo CytoScan Dx		Diagnóstico en el centro original				Total
		Patógenas	No patógenas			
			VOUS	Benignas	No CNV	
Patógenas		105	7	0	20	132
No patógenas	VOUS	22	81	69	199	371
	Benignas	1	21	44	391	457
Total		128	109	113	610	960
PPA*		105/128 = 82,0 % (IC del 95 % 74,5-87,7 %)				
NPA**		805/832 = 96,8 % (IC del 95 % 95,3-97,8 %)				

CNV: En el nivel de las CNV, se calculó la concordancia analítica (es decir, la misma citobanda) como el porcentaje de CNV identificadas por la asistencia sanitaria rutinaria (RPC) identificada por el ensayo CytoScan Dx. En las 960 muestras, la RPC identificó 680 CNV. De estas 680 CNV, CytoScan Dx y la RPC identificaron 639 CNV (concordancia analítica, 639/680 = 94,0 % [IC del 95 %, 91,9 %-95,5 %]). De las 41 faltas de concordancia, 34 de las CNV identificadas en la RPC estaban fuera de las categorías notificables del ensayo CytoScan Dx (2 CNV eran mosaicos de bajo nivel, 1 CNV de cromosoma en anillo de mosaico, 5 CNV en Y en regiones PAR, 14 translocaciones/inversiones equilibradas de CNV, y 12 CNV por debajo de la resolución notificada por el ensayo CytoScan Dx) y el ensayo CytoScan Dx no identificó 7 de ellas.

CNV patógenas: En las 960 muestras, la RPC identificó 322 anomalías (llamadas patógenas), de las cuales 319 (99,1 %) se identificaron mediante el ensayo CytoScan Dx.

Se calculó el rendimiento diagnóstico potencial para los métodos de RPC, así como para el ensayo CytoScan Dx (Tabla 21) como la probabilidad de una interpretación patógena por la RPC o el ensayo CytoScan Dx, estratificada por los métodos de RPC utilizados en los centros de recolección de muestras. Las diferencias en los patrones de utilización de la tecnología en la asistencia sanitaria rutinaria dificulta la interpretación del rendimiento diagnóstico basado en métodos estratificados, por lo que debe interpretarse con precaución. El rendimiento diagnóstico general del 13,3 % para la RPC representa una combinación de varios métodos de RPC orientados por información clínica y parental, mientras que el rendimiento diagnóstico general del 13,8 % para el ensayo CytoScan Dx representa el rendimiento diagnóstico al usar el ensayo CytoScan Dx de forma aislada sin información clínica y a menudo sin datos de pruebas parentales.

Tabla 21. Rendimiento diagnóstico potencial para la RPC y el ensayo CytoScan Dx.

Método de RPC	N	RPC		Ensayo CytoScan Dx	
		Determinaciones patógenas (N)	% de rendimiento diagnóstico (IC del 95 %)*	Determinaciones patógenas (N)	% de rendimiento diagnóstico (IC del 95 %)*
Solo cariotipo	72	10	13,9 % (7,7 %, 23,7 %)	19	26,4 % (17,6 %, 37,6 %)
Cariotipo + FISH	11	6	54,6 % (28,0 %, 78,7 %)	6	54,6 % (28,0 %, 78,7 %)
Cariotipo + FISH + otros**	10	2	20,0 % (5,7 %, 51,0 %)	2	20,0 % (5,7 %, 51,0 %)
Cariotipo + otros	45	2	4,4 % (1,2 %, 14,8 %)	6	13,3 % (6,3 %, 26,2 %)
Solo microarray***	351	10	2,9 % (1,6 %, 5,2 %)	9	2,6 % (1,4 %, 4,8 %)
Microarray + cariotipo	74	11	14,9 % (8,5 %, 24,7 %)	7	9,5 % (4,7 %, 18,3 %)
Microarray + FISH	77	54	70,1 % (59,2 %, 79,2 %)	48	62,3 % (51,2 %, 72,3 %)
Microarray + FISH + otros	2	0	0,0 % (0,0 %, 65,8 %)	0	0,0 % (0,0 %, 65,8 %)
Microarray + cariotipo + FISH + otros	67	6	9,0 % (4,2 %, 18,2 %)	8	11,9 % (6,2 %, 21,8 %)
Microarray + cariotipo + FISH	17	4	23,5 % (9,6 %, 47,3 %)	4	23,5 % (9,6 %, 47,3 %)
Microarray + cariotipo + otros	187	18	9,6 % (6,2 %, 14,7 %)	18	9,6 % (6,2 %, 14,7 %)
Microarray + otros	47	5	10,6 % (4,6 %, 22,6 %)	5	10,6 % (4,6 %, 22,6 %)
Total	960	128	13,3 % (11,3 %, 15,6 %)	132	13,8 % (11,7 %, 16,1 %)

* IC del 95 % calculado mediante el método de puntuación de Wilson.

** Entre los otros se incluyen PCR y MLPA.

*** Microarrays no pertenecientes a Applied Biosystems.

Se representó un total de 43 síndromes clínicos diferentes en el estudio clínico prospectivo. La concordancia de los síndromes se comparó entre la interpretación clínica basada en la RPC y el ensayo CytoScan Dx, con una concordancia positiva de interpretación general del 80,7 %. De las 18 faltas de concordancia, solo una incluía una muestra que no concordaba analíticamente; las otras 17 se debieron a diferencias en la interpretación clínica de laboratorio. La única falta de concordancia analítica fue una muestra que en la RPC se clasificó como síndrome de Nebulette. Los tipos de síndrome y el porcentaje de concordancia positiva de las interpretaciones clínicas se detallan en la Tabla 22.

Tabla 22. Lista de síndromes observados en el estudio prospectivo.

Síndrome	Número de RPC notificadas	Número de concordancias entre CytoScan y RPC	% de concordancia positiva
Microdelección 15q13.3	1	1	100
Microdelección 16p11.2	5	4	80
Microduplicación 16p11.2	3	2	67
Microdelección 16p13.11	2	2	100
Locus de susceptibilidad al trastorno neurocognitivo por microduplicación 16p13.11	2	2	100
Duplicación 17p11.2 / Potocki-Lupski	1	1	100
Microdelección 17q21.3 / Koolen-de Vries	1	1	100
Delección 18p	1	1	100
Delección 1p36	1	1	100
Microdelección 1q21.1	2	1	50
Microdelección 1q21.1 (locus de susceptibilidad a trastornos del desarrollo neurológico)	2	1	50
Locus de susceptibilidad 1q21.1 al síndrome de trombocitopenia con aplasia radial (TAR)	2	2	100
Microduplicación 22q11	5	4	80
Delección 22q13.3 / Phelan-McDermid	1	1	100
Monosomía 2q37	2	2	100
Microdelección 3q29	1	0	0
Delección subtelomérica 9q / Kleefstra	1	1	100
Alagille	1	0	0
Angelman O Prader-Willi	4	3	75
Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRRS) / tumor hamartoma PTEN	1	1	100
Síndrome cardiofaciocutáneo	1	0	0
Síndrome del maullido	3	3	100
Dentinogénesis imperfecta	1	0	0
DiGeorge / síndrome velocardiofacial / microdelección 22q11.21	3	2	67
Down / trisomía 21	11	10	91
Edwards / trisomía 18	2	2	100
Distrofia nebulosa central de François-Neetens	1	0	0
Jacobsen / delección 11q	1	0	0
Klinefelter / XXY	4	2	50
Síndrome de Nebulette	1	0	0
Neurofibromatosis 1 con discapacidad intelectual	1	1	100
Pallister-Killian	1	1	100
Patau / trisomía 13	5	5	100
Smith-Magenis	1	1	100
Deficiencia de sulfatasa esteroidea ligada al X / Ictiosis	2	2	100
Tetrasomía 9p	1	1	100
Trisomía 8	1	1	100
Von Hippel-Lindau	1	1	100
Williams-Beuren	3	3	100
Wolf-Hirschhorn	2	2	100
Duplicación Xq28 (MECP2)	1	1	100
Otros	2	2	100
Total	89	71	80,7

Este dispositivo no está diseñado para usarse con fines de diagnóstico independientes, diagnóstico prenatal (como para conocer el riesgo de la trisomía del par 21), diagnóstico previo a la implantación o para realizar evaluaciones de la población.

Bibliografía

1. Ellison, J.W., Rosenfeld, J.A., and Shaffer, L.G. (2013) "Genetic Basis of Intellectual Disability," *Ann Rev Med* **64**:441-50.
2. Pyatt, R.E. and Astbury, C. (2011) "Interpretation of Copy Number Alterations Identified Through Clinical Microarray-Comparative Genomic Hybridization," *Clin Lab Med* **31**:565–80.
3. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST (2011) American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants; Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. *Genet Med.* **13**(7):680-5.
4. Cooper, G.M., Coe, B.P., Girirajan, S., Rosenfeld, J.A., et al. (2011) "A Copy Number Variation Morbidity Map of Developmental Delay," *Nat Genet* **43**(9):838-46.
5. Sagoo, G.S., Butterworth, A.S., Sanderson, S., et al. (2009) "Array CGH in patients with Learning Disability (Mental Retardation) and Congenital Anomalies: Updated Systematic Review and Meta-Analysis of 19 Studies and 13,926 Subjects," *Genet Med* **11**:139-46.
6. Hochstenbach, R., van Binsbergen, E., Engelen, J., et al. (2009) "Array Analysis and karyotyping: Workflow Consequences Based on a Retrospective Study of 36,325 Patients with Idiopathic Developmental Delay in the Netherlands," *Eur J Med Genet* **52**(4):161-9.
7. Kaminsky, E.B., Kaul, V., and Paschall, J. (2011) "An Evidence-based Approach to Establish the Functional and Clinical Significance of Copy Number Variants in Intellectual and Developmental Disabilities," *Genet Med* **13**(9):777-84.
8. Miller, D.T., Adam, M.P., Aradhya, S., et al. (2010) "Consensus Statement: Chromosomal Microarray is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies," *Am J Hum Genet* **86**(5):749–64.
9. South, S.T. (2011) "Chromosomal Structural Rearrangements: Detection and Elucidation of Mechanisms Using Cytogenomic Technologies," *Clin Lab Med* **31**:513–24.
10. Perry, G.H., Yang, F., Marques-Bonet, T., et al. (2008) "Copy Number Variants and Evolution in Humans and Chimpanzees," *Genome Res* **18**:1698-1700.
11. Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K.R., et al. (2006) "Global Variation in Copy Number in the Human Genome," *Nature* **444**:444-54.
12. Shaikh, T.H., Gai, X., Perin, J.C., et al. (2009) "High-Resolution Mapping and Analysis of Copy Number Variations in the Human Genome: A Data Resource for Clinical and Research Applications," *Genome Res* **19**(9):1682-90.
13. Gibson, J., Morton, N.E., and Collins, A. (2006) "Extended Tracts of Homozygosity in Outbred Human Populations," *Hum Mol Genet* **15**(5): 789-95.

Símbolo



Diagnóstico in vitro



Advertencia



Peligro

Información sobre seguridad

Consulte las hojas de datos de seguridad de cada componente en www.affymetrix.com/IVD. Use ropa protectora, incluidos guantes y protección para los ojos.

Peligro	Contiene	Advertencia/precaución
HYB BUF 1	Cloruro de tetrametilamonio	Es tóxico en caso de ingestión y en contacto con la piel; causa irritación de la piel, irritación ocular grave; puede causar irritación respiratoria. Evite respirarlo y que entre en contacto con la piel o los ojos. Si ello ocurriera, lave la zona inmediatamente. Si presenta irritación de la piel o sarpullido, busque atención médica.
TDT BUF	Ácido cacodílico	Es tóxico en caso de ingestión y en contacto con la piel; causa irritación de la piel, irritación ocular grave; puede causar irritación respiratoria. Evite respirarlo y que entre en contacto con la piel o los ojos. Si ello ocurriera, lave la zona inmediatamente. Si presenta irritación de la piel o sarpullido, busque atención médica.
Advertencia	Contiene:	Precaución
BSA	Glicerol	Causa irritación leve de la piel e irritación de los ojos. Evite que entre en contacto con la piel o los ojos. Si ello ocurriera, lave la zona inmediatamente. Si presenta irritación de la piel o sarpullido, busque atención médica.

Advertencia	Contiene:	Precaución
DNA LIG	Glicerol	Causa irritación leve de la piel e irritación de los ojos. Evite que entre en contacto con la piel o los ojos. Si ello ocurriera, lave la zona inmediatamente. Si presenta irritación de la piel o sarpullido, busque atención médica.
FRAG BUF	Tris[tris(hidroximetilo)aminometano]	Causa irritación leve de la piel e irritación de los ojos. Evite que entre en contacto con la piel o los ojos. Si ello ocurriera, lave la zona inmediatamente. Si presenta irritación de la piel o sarpullido, busque atención médica.
FRAG RGT	Glicerol	Causa irritación leve de la piel e irritación de los ojos. Evite que entre en contacto con la piel o los ojos. Si ello ocurriera, lave la zona inmediatamente. Si presenta irritación de la piel o sarpullido, busque atención médica.
NSP 1	Glicerol	Causa irritación leve de la piel e irritación de los ojos. Evite que entre en contacto con la piel o los ojos. Si ello ocurriera, lave la zona inmediatamente. Si presenta irritación de la piel o sarpullido, busque atención médica.
TAQ ENZ	Glicerol	Causa irritación leve de la piel e irritación de los ojos. Evite que entre en contacto con la piel o los ojos. Si ello ocurriera, lave la zona inmediatamente. Si presenta irritación de la piel o sarpullido, busque atención médica.
TDT ENZ	Glicerol	Causa irritación leve de la piel e irritación de los ojos. Evite que entre en contacto con la piel o los ojos. Si ello ocurriera, lave la zona inmediatamente. Si presenta irritación de la piel o sarpullido, busque atención médica.

Estos materiales contienen azida de sodio: AH BUF (0,02 %), SB 1 (0,01 %), SB2 (0,01 %) y PURIF BDS (<0,1 %). Tenga cuidado durante su eliminación: la acumulación de azida de sodio en las tuberías de plomo y cobre puede formar azidas metálicas muy explosivas.

Fabricante y soporte



Affymetrix Inc.
3450 Central Expressway
Santa Clara, CA 95051, EE. UU.
Teléfono: 408-731-5572
FAX: 408-731-5950
Servicio de atención al cliente
Correo electrónico: support@thermofisher.com
Teléfono: 1-888-362-2447

Representante autorizado



Life Technologies Europe B.V.
Kwartsweg 2
2665 NN Bleiswijk, Países Bajos

El cliente es responsable de la validación de los ensayos y fluorocromos y del cumplimiento de todos los requisitos legales relacionados con los procedimientos y usos del instrumento.
La información incluida en esta guía está sujeta a cambios sin previo aviso.

DECLARACIÓN DE DESCARGO DE RESPONSABILIDAD

HASTA EL GRADO MÁXIMO QUE PERMITA LA LEY, LIFE TECHNOLOGIES O SUS FILIALES NO SERÁN RESPONSABLES DE DAÑOS ACCIDENTALES, INDIRECTOS, CORRECTIVOS, MÚLTIPLES O CONSECUENTES RELACIONADOS CON ESTE DOCUMENTO O DERIVADOS DE ÉL, INCLUIDO EL USO QUE REALICE DE ESTE.

Información importante sobre licencias

Este producto puede estar cubierto por una o más licencias de etiquetado de uso limitado. Mediante el uso de este producto, acepta los términos y condiciones de todas las licencias de etiquetado de uso limitado aplicables.

MARCAS COMERCIALES y derechos de autor

Todas las marcas comerciales son propiedad de Thermo Fisher Scientific y sus filiales, salvo que se especifique lo contrario.
©2018 Thermo Fisher Scientific Inc. Todos los derechos reservados.

N.º de componentes 902092-902095: Estos productos se venden bajo licencia de Clontech Laboratories, Inc., y al comprador de este producto se le otorga un derecho limitado y no exclusivo para usar internamente el producto para las pruebas de diagnóstico in vitro para las cuales fue diseñado. No está permitido usarlo con ningún otro fin, incluido, entre otros, el uso en investigación o aplicaciones terapéuticas o profilácticas, ya sea in vitro, ex vivo o in vivo. Dicha licencia excluye específicamente el derecho de vender o transferir este producto, sus componentes o derivados del mismo a terceros.

Modelo de rótulos

Sobre-rotulo

Importador: INVITROGEN ARGENTINA S.A.
Iturri 1474 | CABA | Rep. Argentina
T 011 4556 0844 | F 011 4556 0744
Director Tecnico: Brenda Aguiar Mat. Nac. 18284
Autorizado por la A.N.M.A.T PM 1569-29
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO – VENTA EXCLUSIVA A LABORATORIOS DE
ANALISIS CLINICOS

Rótulos de origen

1) 902420 - CytoScan Dx Assay Kit

Conteniendo:

2) 902150 - CYTOSCAN DX ARRAY, 6PK

applied biosystems
by Thermo Fisher Scientific

CytoScan™ Dx Array, 6pk

▽ 6 Microarrays 2019-09-18

LOT AABB_1234567 2°C / 8°C

CE **IVD**

REF 902150

(01)00856826006098
(17)190918
(10)AABB_1234567
(240)902150

Made in Singapore

00190215010AABB_1234567171909189100477

Affymetrix, Inc.
3450 Central Expressway,
Santa Clara, CA 95051 USA

EC REP Life Technologies Europe B.V.
Kwartsweg 2, 2685NN
Bleiswijk, The Netherlands

REF S_902150_B_Prev7

3) 902107 - CYTOSCAN DX MOD R L A

CytoScan® Dx Pre-PCR -20°C
MOD R L A

 **24**

REF **902107**  YYYY-MM-DD

LOT **MMYY_XXXXXXX** **CE** **IVD**

NSP 1, NSP 1 BUF, BSA, DNA LIG, DNA LIG BUF, TAQ BUF, GCM, DNTPS, TAQ ENZ, NSP I ADAP, PCR PRIM

 **Read SDS**

Product of USA

 Affymetrix Inc.
3450 Central Expy.
Santa Clara, CA. 95051, USA
www.thermofisher.com

EC REP Life Technologies Europe B.V.
Kwartsweg 2
2665 NN Bleiswijk
The Netherlands

 @0190210710MMYY_XXXXXXX17YYMMDD9112345

 -15°C
-25°C



(01)00856826006142
(17)000000
(10)MMYY_XXXXXXX
(240)902107

4) 902108 - CYTOSCAN DX MOD T E W

CytoScan® Dx Pre-PCR 2-8°C
MOD T E W

 **24**

REF 902108  YYYY-MM-DD

LOT MMYX_XXXXXX **CE** **IVD**

TE BUF, NFW

 **Read SDS**

 2°C 8°C

 @0190210810MMYY_XXXXXX17YYMMDD9112345

 Product of USA

 Affymetrix Inc.
3450 Central Expy.
Santa Clara, CA. 95051, USA
www.thermofisher.com



EC REP Life Technologies Europe B.V.
Kwartsweg 2
2665 NN Bleiswijk
The Netherlands

(01)00856826006159
(17)000000
(10)MMYY_XXXXXX
(240)902108

5) 902109 - CYTOSCAN DX MOD F L H

CytoScan® Dx Post-PCR -20°C
MOD F L H

 **24**

REF **902109**  **YYYY-MM-DD**

LOT **MMYY_XXXXXX** **CE** **IVD**

FRAG RGT, FRAG BUF, TDT ENZ, TDT BUF, DNA LABEL RGT, OCR, HYB BUF 1, HYB BUF 2, HYB BUF 3, HYB BUF 4

 **Read SDS**  **-15°C**
-25°C

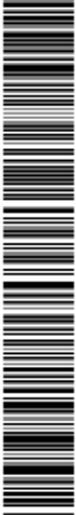
Product of USA

 **Affymetrix Inc.**
3450 Central Expy.
Santa Clara, CA, 95051, USA
www.thermofisher.com



EC REP **Life Technologies Europe B.V.**
Kwartsweg 2
2665 NN Bleiswijk
The Netherlands

(01)00856826006128
(17)000000
(10)MMYY_XXXXXX
(240)902109

 **@0190210910MMYY_XXXXXX17YYMMDD9112345**

6) 902110 - CYTOSCAN DX MOD S AH W PB

CytoScan® Dx Post-PCR 2-8°C
MOD S AH W PB

 24

REF 902110

LOT MMYX_XXXXXX

SB 1, SB 2, AH BUF,
NFW, PURIF BDS

 **Read SDS**

Product of USA

 Affymetrix Inc.
3450 Central Expy.
Santa Clara, CA 95051, USA
www.thermofisher.com

EC REP Life Technologies Europe B.V.
Kwartsveg 2
2665 NN Bleiswijk
The Netherlands

 YYYY-MM-DD

CE IVD

 2°C 8°C



(01)00856826006135
(17)000000
(10)MMYX_XXXXXX
(240)902110

7) 902111 - CYTOSCAN DX MOD E PW

applied biosystems
by Thermo Fisher Scientific

CytoScan™ Dx Post-PCR
15-30°C MOD E PW

REF 902111 **UDI** 

 24

LOT 0000_00000000 (01)00856826006166
(17)000000
(10)0000_00000000
(240)902111

 0000-00-00

ELU BUF, PW BUF  30 °C
15 °C

    www.affymetrix.com/IVD

EC REP Life Technologies Europe B.V.
Kwartsweg 2, 2665 NN Bleiswijk,
The Netherlands

 **Affymetrix, Inc.**
3450 Central Expressway
Santa Clara, CA 95051, USA

Read SDS
Made in Lithuania
LBL0034214 Rev.01.00

 @01902111100000_000000001700000009112345

8) 902090 - FILL, WASH A - 500 ML

applied biosystems
by Thermo Fisher Scientific



@0190209010MMYY_XXXXXXX17YYMMDD9100325

REF 902090
LOT MMYX_XXXXXXX

CytoScan® Dx WS A
Qty: 500 mL

15°C  30°C

 YYYY-MM-DD

 **Read SDS**

Product of USA

 Affymetrix Inc.
3450 Central Expy.
Santa Clara, CA. 95051, USA
www.thermofisher.com

 **IVD**

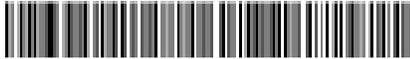


(01)00866826006104
(17)000000
(10)MMYY_XXXXXXX
(240)902090

 Life Technologies Europe B.V.
Kwartsweg 2
2085 NN Bleiswijk
The Netherlands

9) 902091 - FILL, WASH B - 500 ML

applied biosystems
by Thermo Fisher Scientific



@01902091 10MMYY_XXXXXXX 17YYMMDD9100325

REF 902091
LOT MMY_Y_XXXXXXX

CytoScan® Dx WS B
Qty: 500 mL

15°C  30°C

 YYYY-MM-DD

 **Read SDS**

Product of USA

 Affymetrix Inc.
3450 Central Expy.
Santa Clara, CA, 95051, USA
www.thermofisher.com





 Life Technologies Europe B.V.
Kwartsweg 2
2066 NN Bleiswijk
The Netherlands

(81)40854826008111
(17)009000
(10)MMYY_XXXXXX
(240)902091



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: Rótulos y Manual de Instrucciones.

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 56 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.06.18 22:47:20 -03:00

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.06.18 22:47:22 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: 1-0047-3110-006509-23-8

**CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN
PRODUCTO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**

Expediente N° 1-0047-3110-006509-23-8

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por INVITROGEN ARGENTINA S.A ; se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de un nuevo producto con los siguientes datos identificatorios característicos:

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

Nombre Descriptivo: 1) 902420 - CytoScan Dx Assay Kit (contents include the CytoScan Dx Array and all required CytoScan Dx Assay reagents)

Marca comercial: No aplica

Modelos:

Conteniendo:

- 2) 902107 – CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD R L A Reagents
- 3) 902108 – CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD T E W Reagents
- 4) 902109 - CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD F L H Reagents

- 5) 902110 - CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD S AH W PB Reagents
- 6) 902111 - CytoScan Dx Pre-PCR 15 °C – 30 °C MOD E PW Reagents
- 7) 902090 - CytoScan Dx WS A
- 8) 902091 - CytoScan Dx WS B
- 9) 902150 - CytoScan Dx Array, 6pk
- 10) 620969 – CytoScan Dx Library Files
- 11) 610525 – Chromosome Analysis Suite Dx Software

Indicación/es de uso:

1) 902420 - CytoScan Dx Assay Kit para 24 muestras: El ensayo CytoScan™ Dx es un ensayo cualitativo indicado para la detección posnatal de variaciones en el número de copias (VNC) del ADN genómico que se ha obtenido de sangre total periférica procedente de pacientes que han sido remitidos para realizar pruebas cromosómicas según sus cuadros clínicos. El ensayo CytoScan™ Dx ha sido diseñado para detectar CNV asociadas con el retraso del desarrollo, la discapacidad intelectual, las anomalías congénitas o las características dismórficas. Está previsto utilizar los resultados del ensayo junto con otros descubrimientos clínicos y diagnósticos que sean coherentes con las normas de práctica profesional, incluida la confirmación mediante métodos alternativos, la evaluación de los padres, la evaluación genética clínica y el asesoramiento, según sea necesario. Está previsto que sean solo los profesionales sanitarios certificados en citogenética clínica o genética molecular quienes interpreten los resultados del ensayo. El ensayo ha sido diseñado para utilizarse en el sistema GeneChip™ 3000Dx. Asimismo, el ensayo se analizará en el software Chromosome Analysis Suite Dx (ChAS Dx).

Este dispositivo no está diseñado para usarse con fines diagnósticos independientes, para pruebas de preimplantación o prenatales (como para conocer el riesgo de la trisomía del par 21) o para realizar evaluaciones, evaluaciones de la población, o para detectar o evaluar anomalías genéticas adquiridas o somática

Conteniendo:

- 2) 902107 – CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD R L A Reagents: reactivos para el ensayo.
- 3) 902108 – CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD T E W Reagents: reactivos para el ensayo.
- 4) 902109 - CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD F L H Reagents: reactivos para el ensayo.
- 5) 902110 - CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD S AH W PB Reagents: reactivos para el ensayo.
- 6) 902111 - CytoScan Dx Pre-PCR 15 °C – 30 °C MOD E PW Reagents: reactivos para el ensayo.
- 7) 902090 - CytoScan Dx WS A: solución de lavado.
- 8) 902091 - CytoScan Dx WS B: solución de lavado.
- 9) 902150 - CytoScan Dx Array, 6pk: arreglos biológicos.
- 10) 620969 – CytoScan Dx Library Files: software de análisis.
- 11) 610525 – Chromosome Analysis Suite Dx Software: software de análisis.

Forma de presentación: 1) 902420 - CytoScan Dx Assay Kit para 24 muestras

Conteniendo:

- 2) 902107 – CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD R L A Reagents, conteniendo: NSP I, 40 uL; NSP I BUF, 80 uL; BSA, 25 uL; DNA LIG, 80 uL; DNA LIG BUF, 100 uL; TAQ BUF, 1500 uL; GCM, 3000 uL; DNTPS, 2100 uL; TAQ ENZ, 300 uL; NSP I ADAP, 30 uL; PCR PRIM, 660 uL.
- 3) 902108 – CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD T E W Reagents, conteniendo: TE BUF, 24 mL; NFW, 17 mL.
- 4) 902109 - CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD F L H Reagents, conteniendo: FRAG RGT, 40 uL; FRAG BUF, 1400 uL; TDT ENZ, 120 uL; TDT BUF, 470 uL; DNA LABEL RGT, 70 uL; OCR, 100 uL; HYB BUF 1, 8 mL; HYB BUF 2, 700 uL; HYB BUF 3, 350 uL; HYB BUF 4, 50 uL.

- 5) 902110 - CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD S AH W PB Reagents, conteniendo: SB 1, 17 mL; SB 2, 17 mL; AH BUF, 75 mL; NFW, 17 mL; PURIF BDS, 23 mL.
- 6) 902111 - CytoScan Dx Pre-PCR 15 °C – 30 °C MOD E PW Reagents, conteniendo: ELU BUF, 2.5 mL; PW BUF, 15 mL.
- 7) 902090 - CytoScan Dx WS A: 4 botellas x 500 ml.
- 8) 902091 - CytoScan Dx WS B: 4 botellas x 500 ml.
- 9) 902150 - CytoScan Dx Array, 6pk: 4 paquetes de 6.
- 10) 620969 – CytoScan Dx Library Files: software.
- 11) 610525 – Chromosome Analysis Suite Dx Software: software.

Período de vida útil: 1) 902420 - CytoScan Dx Assay Kit

Conteniendo:

- 2) 902107 – CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD R L A Reagents: 24 meses de -25°C a -15°C
- 3) 902108 – CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD T E W Reagents: 24 meses de 2°C a 8°C
- 4) 902109 - CytoScan Dx Pre-PCR -20 °C MOD F L H Reagents: 24 meses de -25°C a -15°C
- 5) 902110 - CytoScan Dx Pre-PCR 2 °C – 8 °C MOD S AH W PB Reagents: 24 meses de 2°C a 8°C
- 6) 902111 - CytoScan Dx Pre-PCR 15 °C – 30 °C MOD E PW Reagents: 24 meses de 15°C a 30°C
- 7) 902090 - CytoScan Dx WS A: 24 meses de 15°C a 30°C
- 8) 902091 - CytoScan Dx WS B: 24 meses de 15°C a 30°C
- 9) 902150 - CytoScan Dx Array, 6pk: 24 meses de 2°C a 8°C
- 10) 620969 – CytoScan Dx Library Files: no aplica
- 11) 610525 – Chromosome Analysis Suite Dx Software: no aplica

Nombre del fabricante:

AFFYMETRIX, INC.

Lugar de elaboración:

3450 Central Expressway, Santa Clara, California - 95051
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Grupo de Riesgo: Grupo C

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PM 1569-29 , con una vigencia de cinco (5) años a partir de la fecha de la Disposición autorizante.

1-0047-3110-006509-23-8

Nº Identificadorio Trámite: 53338

am

Digitally signed by PEARSON Enriqueta Maria
Date: 2024.07.04 17:21:43 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.07.04 17:21:44 -03:00