

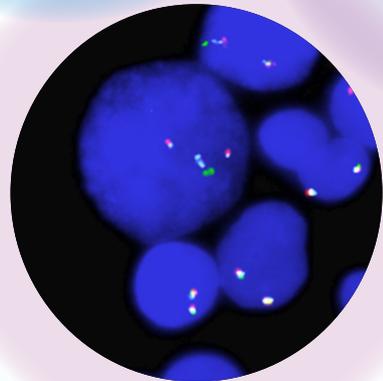
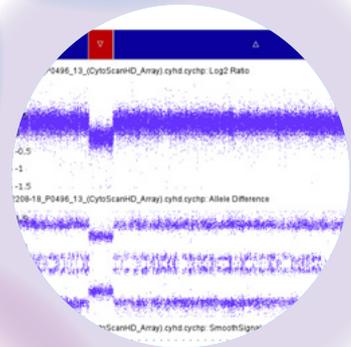
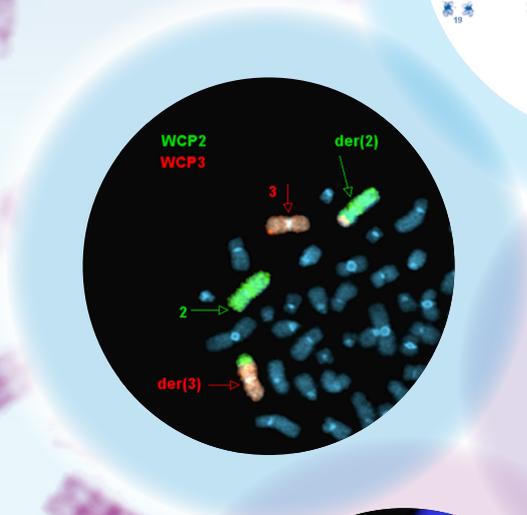
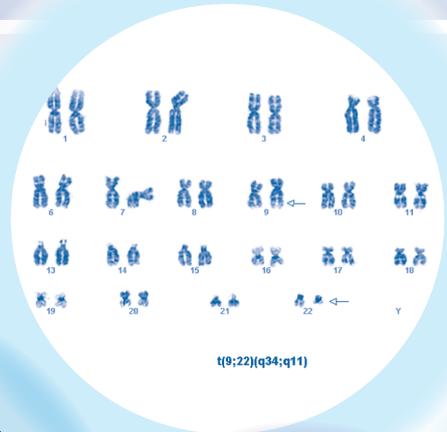
Con el aval científico:



Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia
Fundación Española de Hematología y Hemoterapia

ANÁLISIS CITOGENÓMICOS APLICADOS A NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

RECOMENDACIONES PREANALÍTICAS ANALÍTICAS Y POSTANALÍTICAS



Editoras

Blanca Espinet
María Laura Blanco
Dolors Costa
Esther Cuatrecasas
Neus Ruiz-Xivillé

Este documento ha sido elaborado por miembros del Grupo de Trabajo de Citogenética Hematológica de la Associació Catalana de Ciències del Laboratori Clínic (ACCLC), del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH) de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) y de la Comisión de Genética Oncohematológica de la Asociación Española de Genética Humana (AEGH).

Documento avalado por la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) y la Asociación Española de Genética Humana (AEGH).

ISBN: 978-84-09-29357-5

ANÁLISIS CITOGENÓMICOS APLICADOS A NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

RECOMENDACIONES PREANALÍTICAS ANALÍTICAS Y POSTANALÍTICAS

Coordinadoras

Blanca Espinet

Coordinadora global y postanalítica

María Laura Blanco

Preanalítica

Dolors Costa

Citogenética

Esther Cuatrecasas

Hibridación *in situ* fluorescente

Neus Ruiz-Xivillé

Microarrays genómicos

Autores *(por orden alfabético)*

Preanalítica

Antonio Almazán

Departamento de Citogenética y Biología Molecular. Atrys Health, Barcelona.

María Laura Blanco

Secció Citogenètica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Montserrat Espadaler

Secció Citogenètica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Nieves Fernández

Secció Citogenètica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Francisca Fuentes

Secció Citogenètica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Jonathan García

Departamento de Citogenética y Biología Molecular. Atrys Health, Barcelona.

Elisenda Portabella

Secció Citogenètica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Autores (por orden alfabético)

Citogenética

Desireé Carbonell

Departament de Citogenètica. Laboratori Cerba Internacional, Sabadell, Barcelona.

Dolors Costa

Àrea de Citogenètica Oncohematològica. Secció d' Hematopatologia. Servei d'Anatomia Patològica. Hospital Clínic, Barcelona.

Rosa Ana de la Chica

Comissió de Genètica i Reproducció Humana. Col·legi de Biòlegs de Catalunya, Barcelona.

Aurora Fortuny

Departament de Citogenètica. Laboratori Echevarne, Barcelona.

Gloria Hidalgo-Gómez

Servei d'Hematologia. Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona.

Margarita Ortega

Servei d'Hematologia. Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona.

Roser Pujol (inestabilidad cromosómica)

Unitat Mixta de Recerca en Medicina Genòmica. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)-Institut de Recerca Sant Pau. Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER). Barcelona.

Elisabet Talavera

Unitat de Citogenètica. Laboratori ICS. Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida.

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Naima Aloui

Departamento de Citogenética y Genética Molecular. Laboratori Cerba Internacional, Sabadell, Barcelona.

Esther Cuatrecasas

Laboratori de Genètica-Citogenètica. Servei Diagnòstic de Laboratori. Servei de Medicina Genètica i Molecular. Instituto Pediátrico de Enfermedades Raras (IPER). Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona.

María Antonia Garrido

Departament de Genètica. Laboratori CatLab, Terrassa, Barcelona.

María Jiménez

Departament de Genètica. Laboratori CatLab, Terrassa, Barcelona.

Núria Pujol

Departamento de Citogenética y Genética Molecular. Laboratori Cerba Internacional, Sabadell, Barcelona.

Marta Salido

Laboratori de Citogenètica Molecular. Servei de Patologia. Hospital del Mar. Barcelona Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques. Programa de Recerca en Càncer. IMIM, Barcelona.

Alba Verge

Departamento de Citogenética y Genética Molecular. Laboratori Cerba Internacional, Sabadell, Barcelona.

Microarrays genómicos

Sílvia Beà

Àrea de Citogenètica Oncohematològica. Secció d'Hematopatologia. Servei d'Anatomia Patològica. Hospital Clínic, Barcelona. IDIBAPS. CIBERONC. Universitat Autònoma de Barcelona.

Anna Puiggros

Laboratori de Citogenètica Molecular. Servei de Patologia. Hospital del Mar. Barcelona. Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques. Programa de Recerca en Càncer. IMIM, Barcelona.

Sílvia Ramos

Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques. Programa de Recerca en Càncer. IMIM, Barcelona.

Neus Ruiz-Xivillé

Secció de Citogenètica. Servei Laboratori d'Hematologia. Institut Català d'Oncologia (ICO). Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona, Barcelona. Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC). Badalona. Universitat Autònoma de Barcelona.

Postanalítica

Rosa Collado

Servicio de Hematología. Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Valencia.

Blanca Espinet

Laboratori de Citogenètica Molecular. Servei de Patologia. Hospital del Mar. Barcelona Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques. Programa de Recerca en Càncer. IMIM, Barcelona.

Isabel Granada

Secció de Citogenètica. Servei Laboratori d'Hematologia. ICO. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona, Barcelona. IJC. Universitat Autònoma de Barcelona.

Sandra Rodríguez-Perales

Unidad de Citogenética Molecular. Programa de Genética del Cáncer Humano. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid.

Emma Triviño

Departament de Genètica. Laboratoris CatLab, Terrassa, Barcelona.

Agradecimientos

La edición de este manual ha sido posible, en parte, gracias a la colaboración de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia SEHH), la Asociación Española de Genética Humana (AEGH) y de Werfen.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 6 |
| 2. FASE PREANALÍTICA | 6 |
| 2.1. Formularios de petición de las técnicas | 6 |
| 2.2. Selección de la muestra, condiciones de recogida y envío | 8 |
| 2.2.1. Tipo de muestra para cariotipo e hibridación <i>in situ</i> fluorescente | 8 |
| 2.2.2. Tipo de muestra para <i>microarrays</i> genómicos | 9 |
| 2.2.3. Contenedores para el transporte | 10 |
| 2.3. Tratamiento de muestras de casos urgentes y prioritarios | 11 |
| 2.4. Tratamiento de muestras no adecuadas o subóptimas para el análisis | 11 |
| 2.5. Personal | 12 |
| 2.6. Instalaciones y servicios | 13 |
| 2.6.1. Equipos | 13 |
| 2.6.2. Mantenimiento | 14 |
| 2.7. Reactivos | 15 |
| 2.7.1. Registro de reactivos | 15 |
| 2.7.2. Ficha de seguridad | 15 |
| 2.7.3. Almacenaje | 15 |
| 2.7.4. Medidas de prevención y protección | 15 |
| 2.7.5. Sistema de gestión de residuos | 15 |
| 3. FASE ANALÍTICA | 16 |
| 3.1. Técnica de citogenética con bandas G | 16 |
| 3.1.1. Conceptos básicos | 16 |
| 3.1.2. Descripción de la técnica de obtención de metafases | 16 |
| 3.1.3. Recomendaciones para el análisis cromosómico | 18 |
| 3.1.4. Ensayo de inestabilidad cromosómica en linfocitos de sangre periférica | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2. Técnica de hibridación <i>in situ</i> fluorescente | 22 |
| 3.2.1. Conceptos básicos | 22 |
| 3.2.2. Tipos de muestras y de sondas | 22 |
| 3.2.3. Procedimiento técnico | 25 |
| 3.2.4. Análisis y evaluación de la competencia | 26 |
| 3.2.5. Validación de la técnica | 28 |
| 3.3. Técnica de <i>microarrays</i> genómicos..... | 30 |
| 3.3.1. Conceptos básicos | 30 |
| 3.3.2. Procedimiento técnico | 31 |
| 3.3.3. Análisis de datos e interpretación de los resultados | 32 |
| 4. FASE POSTANALÍTICA..... | 35 |
| 4.1. Redacción de informes | 35 |
| 4.1.1. Descripción analítica..... | 37 |
| 4.1.2. Interpretación de los resultados | 38 |
| 4.2. Tiempos de emisión de informes..... | 39 |
| 4.3. Almacenaje, custodia y preservación de datos y documentos, (peticiones, informes, imágenes, datos de <i>microarrays</i> genómicos)..... | 39 |
| 4.4. Almacenaje de muestras (<i>pellets</i>, extensiones, ADN)..... | 40 |
| 4.5. Gestión de la Calidad | 40 |
| 4.5.1. Programas de evaluación externa de calidad | 40 |
| 4.5.2. Acreditación y certificación de laboratorios..... | 41 |
| 4.6. Confidencialidad | 43 |
| 4.6.1. Conceptos básicos | 43 |
| 4.6.2. Archivos informatizados | 43 |
| 4.6.3. Archivos en papel | 44 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA | 44 |

1. Introducción

Las neoplasias hematológicas tienen origen clonal y se caracterizan por presentar gran heterogeneidad genética. Esta heterogeneidad se explica por distintos mecanismos genéticos, entre ellos las alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales, principalmente deleciones, inversiones, duplicaciones o amplificaciones y translocaciones. Estas alteraciones conducen a la activación de protooncogenes o a la inactivación de genes supresores de tumores que generan inestabilidad genómica.

Muchas de estas alteraciones cromosómicas se utilizan en la práctica clínica diaria como biomarcadores diagnósticos, pronósticos o predictivos de respuesta al tratamiento. Las principales técnicas utilizadas para detectar este tipo de alteraciones genéticas, que implican regiones de ADN de gran tamaño, son las que llamamos técnicas citogenómicas: la citogenética con bandas G, la hibridación *in situ* fluorescente y los *microarrays* genómicos.

El objetivo de este documento es describir de forma práctica las principales recomendaciones preanalíticas, analíticas y postanalíticas en los estudios citogenómicos aplicados a neoplasias hematológicas.

Este documento ha sido elaborado siguiendo un proceso participativo y consensuado, según la experiencia de citogenetistas de distintos centros públicos y privados, pertenecientes a l'Associació Catalana de Ciències del Laboratori Clínic (ACCLC), al Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH) de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) y a la Comisión de Genética Oncohematológica de la Asociación Española de Genética Humana (AEGH).

2. Fase preanalítica

2.1. Formularios de petición de las técnicas

Los formularios de petición deben estar correctamente cumplimentados por el facultativo, siendo esencial que este facilite toda la información posible al laboratorio para la correcta realización e interpretación de las pruebas solicitadas. Entre los datos considerados esenciales destacan:

- **Identificación.** Asignación de un código de identificación que remita inequívocamente a la muestra y su trazabilidad. La muestra debe llegar correctamente identificada desde el centro de extracción. Es recomendable que las muestras sean identificadas de nuevo en el centro receptor (laboratorio) siguiendo una numeración propia a fin de mantener un sistema de clasificación y almacenamiento de muestras homogéneo.
- **Urgencia.** Ordinaria o prioritaria. Cualquier caso es susceptible de ser priorizado, siguiendo los supuestos contemplados en el apartado 2.3.
- **Datos personales del paciente.** Se refiere a la identificación del paciente: nombre, apellidos, número de historia clínica o código de identificación unívoco asignado en el centro de origen, además de las características relevantes para el diagnóstico. Entre los datos personales destacan:
 - **Sexo.** Permite identificar con claridad los casos de pacientes trasplantados de médula ósea (MO) con donantes de sexo opuesto al del receptor, con el fin de poder formular correctamente los casos de quimerismo. Por otra parte, también puede ser útil en la trazabilidad de la muestra.
 - **Edad.** Es crucial que los laboratorios dispongan de la fecha de nacimiento o edad del paciente. Es un dato demográfico que está estrechamente relacionado con la incidencia de algunas hematopatías y además permite valorar adecuadamente la pérdida de cromosomas sexuales, que puede estar asociada a la edad.
 - **Sospecha diagnóstica.** Orientación clínica del caso que determinará tanto los análisis a realizar como el protocolo de procesamiento y la urgencia.
 - **Datos clínicos adicionales:**
 - Momento evolutivo de la enfermedad (debut/diagnóstico, pre- o postratamiento, progresión o recaída).
 - Tipo de tratamiento (resistencia o no).
 - Sexo del donante en caso de trasplante alogénico.
 - Datos de analíticas previas (cariotipos, hibridación *in situ* fluorescente –FISH–, pruebas moleculares o *microarrays* genómicos).

- Información de anatomía patológica.
- Antecedentes personales y familiares, así como observaciones que el clínico considere relevantes (planes de medicación, lugar de procedencia del paciente, etnia, etc.). Es recomendable incluir un apartado en el formulario de solicitud para estos datos.
- **Datos del centro solicitante.** Entre ellos debe constar tanto el nombre del facultativo que realiza la solicitud como los datos del centro médico solicitante.
- **Fecha de extracción.** Día y hora (si es posible). La demora entre extracción y llegada al laboratorio puede invalidar los resultados.
- **Tipo de muestra.** MO, sangre periférica (SP), biopsia ganglionar o de tejido, tejido parafinado y/o líquidos biológicos afectados.
- **Estudio solicitado.** Las pruebas por realizar en el laboratorio deberán ser especificadas claramente en la hoja de solicitud. Además, el laboratorio debería poder añadir pruebas complementarias en función de la sospecha diagnóstica y los resultados obtenidos, siempre con el consentimiento del clínico y del centro solicitante.
- **Consentimiento informado.** El formulario de solicitud debe ir acompañado del consentimiento informado con la firma del paciente o de sus tutores, en el caso de que se trate de un menor de edad o de un paciente incapacitado.

Desde el punto de vista jurídico, el documento de consentimiento informado está redactado con el objetivo fundamental de cumplir los requisitos que se exigen en la Ley básica 41/2002, de 14 de noviembre, reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información, y documentación clínica⁽¹⁾.

La Ley 14/2007 de investigación biomédica⁽²⁾ prescribe explícitamente un conjunto de garantías en relación con los análisis genéticos y las muestras biológicas dentro del ámbito de la protección de datos de carácter personal y exige el consentimiento previo a esa obtención de muestras y su análisis.

Pese a que la ley se refiere en muchas ocasiones a la investigación biomédica, en muchos de sus apartados se hace extensiva a los análisis genéticos de forma genérica y, por ello, a la rutina asistencial. El artículo 47 especifica que los pacientes deben recibir la información adecuada por escrito antes de prestar su consentimiento expreso. La información recibida debe contener:

- **Finalidad** del análisis genético para el cual consiente.
- **Lugar** de realización del análisis y destino de la muestra biológica al término del mismo.
- **Personas que tendrán acceso** a los resultados de los análisis cuando aquellos no vayan a ser sometidos a procedimientos de disociación o de anonimización.
- Advertencia sobre la **posibilidad de descubrimientos inesperados** y su trascendencia para el sujeto, así como sobre su facultad para decidir si desea recibir dicha información.
- Advertencia de la **implicación que puede tener para sus familiares** la información que se llegue a obtener.
- La posibilidad de **revocar en cualquier momento el consentimiento**, al propio análisis y a cualquier otro uso de la muestra.
- **Compromiso de suministrar consejo genético**, una vez obtenidos y evaluados los resultados del análisis.

En el caso de análisis genéticos a varios miembros de una familia, los resultados se archivarán y comunicarán a cada uno de ellos de forma individualizada. En el caso de personas incapacitadas o menores, se informará a sus tutores o representantes legales.

Respecto a cómo prestar la información y recoger el consentimiento, deben considerarse algunas situaciones específicas, como aquellas en que:

- El paciente tenga alguna discapacidad que requiera un formato específico para recibir o entender los documentos de información y consentimiento.
- Sea necesario dar la información y recibir el consentimiento a través de un representante, como en el caso de los menores de edad.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, nos parece recomendable que la información que debe recibir el paciente conste en el propio consentimiento o bien se adjunte a él y, en este sentido, proponemos modelos (Anexo 1).

2.2. Selección de la muestra, condiciones de recogida y envío

Los centros peticionarios deberán conocer las condiciones de recogida y envío de muestras. Para ello, el centro que realiza el análisis deberá proporcionar un documento previamente consensuado, donde se recojan todos los requerimientos para este fin. Esta información deberá constar en la cartera de servicios del laboratorio y, a poder ser, en la página web del mismo.

2.2.1. Tipo de muestra para cariotipo e hibridación *in situ* fluorescente

- Para las leucemias agudas (LA) la muestra recomendada es la MO, aunque también puede realizarse con SP en caso de expresión periférica. Debe recogerse el producto de la primera aspiración.
- Para neoplasias mieloides, la muestra recomendada es la MO. La SP es apropiada en caso de una expresión periférica, en casos de fibrosis medular y en estudios de FISH en neoplasias mieloproliferativas (NMP) con eosinofilia (reordenamientos de *FIP1L1-PDGFR*, *PDGFRB* o *FGFR1*, *JAK2*, por ejemplo).
- Para las neoplasias linfoproliferativas, la muestra ideal es una biopsia ganglionar o del tejido (en fresco o parafinada) y/o líquidos biológicos afectados (líquido cefalorraquídeo, pleural, ascítico, humor vítreo, lavado broncoalveolar, etc.). Para aquellos pacientes con evidencia de expresión periférica y/o de infiltración medular, la muestra de SP o de MO sería una alternativa.
- En el caso de una leucemia linfática crónica (LLC), la muestra recomendada es la SP por su facilidad de obtención. Podría considerarse utilizar MO en caso de infiltración y/o ausencia de población clonal en SP.
- Para el estudio de inestabilidad cromosómica en la anemia de Fanconi (AF), la muestra recomendada es SP. En caso de no obtener metafases, se puede realizar en fibroblastos obtenidos a partir de una biopsia de piel.

Para estudios de FISH pueden ser útiles las extensiones celulares (de aspirado medular, SP o tejido) en el caso de que el material sea insuficiente para cultivo.

La información recogida en este apartado se resume en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Tipo y volumen de muestra para citogenética convencional/FISH y estudio de fragilidad cromosómica según sospecha diagnóstica.

| Sospecha diagnóstica | LA | LMC/Otras NMP | SMD | MM | LLC | Linfomas | AF |
|----------------------|--|---------------|-----|-----------------|---------------------------|--|---------------------------|
| Muestra | MO ^a /SP | MO | MO | MO ^b | SP ^c | Ganglio linfático/ Tejido infiltrado (SP, MO...) | SP ^d |
| Medio de recogida | Tubo heparina sodio/litio o tubo con medio de transporte | | | | Tubo heparina sodio/litio | En recipiente estéril en seco/En medio de cultivo con heparina | Tubo heparina sodio/litio |
| Volumen muestra | 1-2 mL | | | | 5-10 mL | 5 mm ³ | 3-5 mL |

^a Debe recogerse el producto de la primera aspiración; ^b cantidad de células antes de la separación inmunomagnética; ^c si la muestra es escasa, priorizar el cultivo con CpG+IL2; ^d habitualmente muestra con escasa celularidad, si no se obtienen metafases debe hacerse el diagnóstico en cultivo de fibroblastos
AF: anemia de Fanconi; LA: leucemia aguda; LLC: leucemia linfocítica crónica; LMC: leucemia mielóide crónica; MM: mieloma múltiple; MO: médula ósea; NMP: neoplasia mieloproliferativa; SMD: síndrome mielodisplásico; SP: sangre periférica

Volumen y anticoagulante

- **MO.** Serán necesarios 1-2 mL de la primera extracción, recogidos en tubo de heparina de sodio/litio o bien con medio de transporte (RPMI-1640 suplementada con un 1% de heparina sodio/litio). En el caso de estudios realizados a partir de la muestra sin cultivar, también puede utilizarse una muestra conservada en tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) –por ejemplo, FISH en mieloma múltiple (MM)–.
- **SP.** Serán necesarios 5-10 mL de muestra recogida en tubos de heparina de sodio o litio. En el caso de estudios realizados a partir de la muestra sin cultivar, también puede utilizarse una muestra conservada en tubo con EDTA (por ejemplo, FISH en LLC).
- **Ganglios linfáticos y otros tejidos.** Será necesario un fragmento de 5 mm³ como mínimo, recogido en envase estéril. Es preferible no utilizar medio para su conservación salvo que se prevea una demora en el transporte.
- **Líquidos biológicos (líquido cefalorraquídeo, sinovial, pleural, etc.).** El volumen necesario viene condicionado por la infiltración tumoral. Se recoge en tubos sin anticoagulante y a temperatura ambiente.
- **Tejido parafinado.** Serán necesarios 2 cortes/secciones de tejido de 3-4 µm colocados sobre portas cargados positivamente y un corte seriado teñido con hematoxilina/eosina (H&E) en el que se indique la región tumoral. Solo los tejidos conservados en formol tamponado neutro (formalina) son adecuados para FISH (Figura 1).

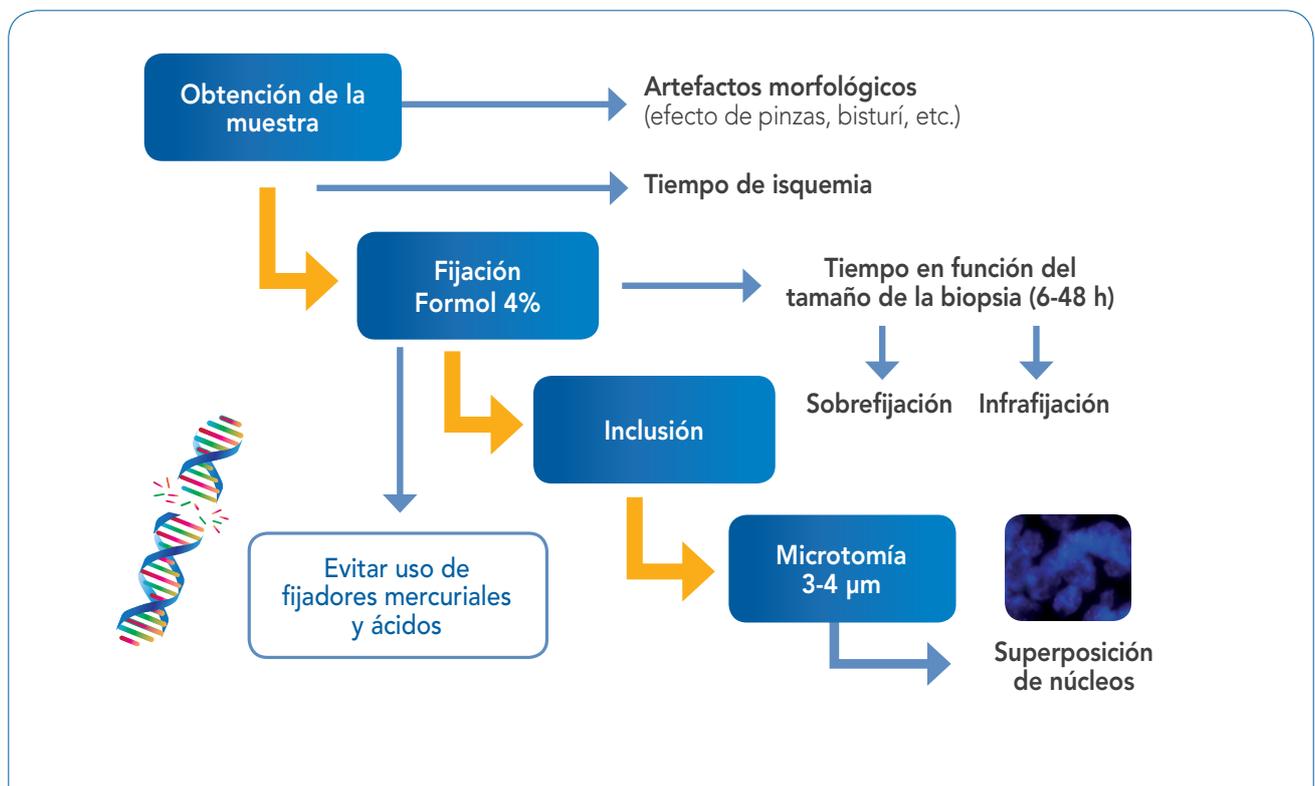


Figura 1. Pasos críticos en el procesamiento de muestras de tejido incluido en parafina para su posterior análisis mediante FISH.

El transporte puede realizarse a temperatura ambiente, siempre y cuando las muestras se mantengan a temperaturas no superiores a los 40 °C y no inferiores a los 0 °C, protegiéndolas de la luz directa del sol. Debe consignarse la fecha en la que se realizó la extracción.

2.2.2. Tipo de muestra para *microarrays* genómicos

- La muestra de estudio será la misma que la recomendada para las técnicas citogenéticas clásicas, aunque es importante garantizar una infiltración mínima de aproximadamente un 20% debido a la sensibilidad limitada de la técnica de *microarrays*. Se puede realizar con cualquier tipo de muestra (fresca, congelada, tejido en parafina, células fijadas).

- El estudio de *microarrays* se realiza a partir de ADN genómico: la extracción puede realizarse mediante kits comerciales basados en columnas de sílica o de bolas magnéticas, o bien por métodos clásicos de precipitación salina y/o fenol/cloroformo. Es aconsejable que el *buffer* de disolución final del ADN sea bajo en sales. Las mejores opciones de *buffer* son el agua libre de nucleasas (ADNsas y ARNsas) o Buffer TE®, 1X pH 8.0 (con baja concentración de EDTA).
- El ADN obtenido debe ser de buena calidad: la cantidad total y la concentración mínima dependerán del tipo de plataforma que se vaya a usar (Tabla 2). La concentración y la ratio de calidad del ADN se obtendrán mediante lectura en un espectrofotómetro (por ejemplo, NanoDrop®) y, en caso de que sea necesario (o el servicio de *microarrays* así lo determine), se puede medir la concentración mediante fluorimetría (por ejemplo, Qubit®). Como norma general, es aconsejable partir de un mínimo de 200 ng de ADN, a una concentración superior a 20 ng/μL. En caso de obtener una concentración menor, se puede concentrar usando SpeedVac®.

Tabla 2. Cantidad y concentraciones de ADN según la plataforma de *microarrays* genómicos.

| Tipo de <i>microarray</i> | Procedencia del ADN | Cantidad de ADN | Concentración de ADN | Controles adicionales recomendados* |
|--|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------|---|
| <i>Microarray</i> de CGH | Muestra en fresco/ congelada | 500-1.000 ng (mínimo 200 ng) | > 20 ng/μL | Gel de agarosa (alto peso molecular) |
| <i>Microarray</i> de CGH | Tejido en parafina | 1.000-2.000 ng (mínimo 500 ng) | > 20 ng/μL | PCR cuantitativa (> 100 pb) |
| <i>Microarray</i> de SNP (CytoScan®, Thermo Fisher) | Muestra en fresco/ congelada | 500 ng (mínimo 200 ng) | 100 ng/μL (> 20 ng/μL) | Gel de agarosa (alto peso molecular) |
| <i>Microarray</i> de SNP (OncoScan®, Thermo Fisher) | Tejido en parafina | 200 ng (mínimo 80 ng) | 50 ng/μL (> 20 ng/μL) | Gel de agarosa (alto peso molecular) |

* Los controles adicionales se realizarán en función de las recomendaciones de la casa comercial o del servicio que realice el protocolo técnico. En general, los *microarrays* de CGH requieren un control más estricto que las plataformas de *microarrays* de SNP.

Las ratios de absorbancia deben ser óptimas, con valores alrededor de 1,8 en la ratio 260/280 (indicativo de ADN "puro") y, como medida secundaria de pureza, la ratio 260/230 debe estar en el rango 2,0-2,2. Unas ratios inferiores pueden ser indicativas de contaminación por proteínas o componentes de los procesos de extracción de ADN. Además, para los *microarrays* de hibridación genómica comparada (CGH), se aconseja evaluar la integridad del ADN mediante un gel de agarosa.

Se espera una banda intensa y de alto peso molecular. Si hay presencia de un *smear* de menor peso molecular, es indicativo de degradación y puede afectar a la calidad de la hibridación. Un control adicional recomendable en el caso de los *microarrays* de CGH a partir de material fijado en formol e incluido en parafina es realizar una PCR *multiplex* y asegurar que aparecen bandas superiores o iguales a 200 pb.

Si solo se detectan bandas inferiores a 100 pb es indicativo de degradación del ADN y no se aconseja realizar el *microarray* de CGH, ya que la dispersión de la hibridación sería demasiado elevada. En el caso de los *microarrays* de SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) no es necesario que los fragmentos de ADN sean mayores de 100 pb, dado que la tecnología está optimizada para ADN muy degradado y las sondas interrogan regiones de solo 40 pb.

2.2.3. Contenedores para el transporte

Para el transporte de las muestras clínicas por vía terrestre debe cumplirse la normativa contemplada en el Acuerdo europeo sobre el transporte internacional de mercancías peligrosas por carretera⁽³⁾ y en la Resolución relativa al transporte de muestras diagnósticas^(4,5). El propio laboratorio puede suministrar los contenedores a los centros extractores para garantizar el mantenimiento de las condiciones preanalíticas adecuadas.

2.3. Tratamiento de muestras de casos urgentes y prioritarios

Existen muestras que, por la gravedad de la patología, la necesidad de inicio de un tratamiento precoz u otros factores, requieren un tratamiento urgente o prioritario:

- LA al diagnóstico.
- Leucemias en recaída.
- Leucemia mieloide crónica (LMC) al diagnóstico.
- Síndromes mielodisplásicos (SMD) de alto grado.
- Sospecha de AF pendiente de trasplante medular inminente.

2.4. Tratamiento de muestras no adecuadas o subóptimas para el análisis

Entre las muestras recibidas en el laboratorio de citogenética, algunas pueden no cumplir las condiciones preanalíticas y, por tanto, dichas muestras no serían óptimas para la realización de los estudios solicitados.

En estos casos, es crucial poder identificar el origen de la no idoneidad de las muestras, para así comunicar al centro solicitante la situación, abrir una incidencia, buscar una posible solución y evitar, junto con el centro solicitante, que se repitan estas situaciones en el futuro.

Cada laboratorio definirá unos criterios de conformidad para la aceptación o no de las muestras recibidas. Estos criterios deben basarse en:

- **Identificación correcta de la muestra:**
 - Etiquetado adecuado y legible.
 - Datos legibles en la petición o el formulario.
- **Datos fundamentales para el procesamiento:**
 - Nombre y sexo del paciente.
 - Edad o fecha de nacimiento.
 - Motivo de la solicitud o sospecha diagnóstica.
 - Tipo de muestra.
- **Muestras no adecuadas o subóptimas:**
 - **Muestra con anticoagulante inadecuado.** Incidencia habitual para cultivos celulares con muestras conservadas en anticoagulante EDTA, pues inhibe el crecimiento y raramente se obtienen metafases. Lo ideal es obtener una nueva muestra; en caso contrario, se puede realizar un cultivo celular tras realizar lavados de la muestra con suero fisiológico.
 - **Volumen insuficiente.** Incidencia habitual cuando se solicitan varios estudios para una misma muestra. En estos casos ha de priorizarse el estudio cuyo resultado teórico presente un mayor rendimiento diagnóstico y/o consensuar con el facultativo solicitante.
 - **Tipo de muestra inadecuada para la hemopatía a estudio.** En estos casos es conveniente ponerse en contacto con el facultativo solicitante, pues puede ser un error en la información recibida (del tipo de estudio a realizar o de la sospecha diagnóstica).
 - **Problemas en la conservación de la muestra.** Problemas durante el transporte o el tiempo de envío. La muestra puede resultar coagulada, hemolizada o con posible contaminación (muestras derramadas o tapones mal cerrados). Se debe valorar si la muestra puede ser analizada (bajo seguimiento) o si se solicita una nueva muestra.

Las incidencias se resolverán de manera interna por el laboratorio o serán puestas en conocimiento del centro de extracción o del facultativo responsable. Para ello, deben existir vías de comunicación efectivas entre las partes implicadas. La comunicación fluida entre el centro de extracción y el laboratorio es básica, además, para evitar la reiteración de errores en la preanalítica. Es esencial definir una distribución de responsabilidades efectiva.

2.5. Personal

El personal del laboratorio de citogenética debe cumplir con los requisitos formativos establecidos por la normativa del centro. Las actividades de formación continuada deben incluir programas de seguridad en el trabajo, medio ambiente y salud laboral, además de contenidos relacionados con la actividad propia del laboratorio. La actividad formativa del personal debe quedar registrada.

El personal debería ser suficiente para asegurar que las ausencias por vacaciones y/o bajas laborales quedan cubiertas y no supongan un retraso en la entrega de resultados, o bien tener un centro alternativo designado para enviar muestras en caso de no poder cumplir los tiempos de entrega⁽⁶⁾.

La organización del personal del laboratorio puede variar dependiendo del centro u organismo al cual pertenezca. La siguiente estructura puede servir de ejemplo de organización:

- **Personal administrativo/Documentalista sanitario.** Formación profesional de grado superior. Es responsabilidad del documentalista:
 - Redacción de informes clínicos, documentación sanitaria y gestión de datos.
 - Verificar que se cumplen los requisitos preanalíticos.
 - Registrar las pruebas en el sistema informático de laboratorio.
 - Resolución de incidencias relacionadas con los datos del estudio o comunicación al facultativo responsable del laboratorio.
 - Ampliación de estudios (dado que conlleva un aumento del gasto, se recomienda contacto directo entre facultativos).
- **Personal técnico.** Formación profesional de grado superior. Es responsabilidad del técnico de laboratorio:
 - Efectuar el triaje de las muestras.
 - Manipular las muestras, ejecutar el procedimiento técnico y su control de calidad.
 - Registrar las incidencias y/o no conformidades asociadas con la cantidad y la calidad de las muestras e informar de ello al facultativo responsable.
 - Almacenar, controlar y archivar las muestras, los resultados y registros.
- **Facultativo/Técnico superior.** Licenciatura o grado en Medicina, Biología, Biomedicina, Bioquímica, Química y sus grados derivados. Es responsabilidad del facultativo/técnico superior:
 - Realizar la validación clínica, la interpretación y el análisis de los diagnósticos y los resultados obtenidos.
 - Interpretar las peticiones correspondientes y solicitar los estudios complementarios necesarios.
 - Atender las consultas relacionadas con los aspectos analíticos y semiológicos de las técnicas a su cargo.
 - Participar en la resolución de las incidencias y/o no conformidades.
 - Participar en comités clínicos.

Los análisis citogenéticos deben ser realizados por personal especializado que esté en posesión de titulaciones superiores. A dichas titulaciones se les puede añadir en situaciones excepcionales aquellos profesionales que estén en posesión de una titulación de formación profesional de grado superior como son el técnico superior en Laboratorio Clínico y Biomédico y el técnico superior en Anatomía Patológica y Citodiagnóstico, y que cuenten con la suficiente experiencia en el análisis citogenético.

Actualmente, en el Estado español no existe un programa de formación específico en citogenética. Por ello, para considerar al personal como habilitado para realizar estudios citogenéticos, interpretar los resultados obtenidos y emitir informes, deben cumplirse unos periodos mínimos de experiencia, adquirida mediante el trabajo diario tutorizado en un laboratorio de citogenética hematológica.

Los periodos aconsejados son de un año para citogenética convencional o *microarrays* y de 6 meses para FISH. La formación debe incluir tanto el aspecto técnico como clínico, por lo que se recomienda participar, según la agenda del laboratorio, en las discusiones de los casos clínicos y de las indicaciones de las pruebas citogenéticas.

El personal en formación debe tomar parte de los controles externos de calidad y superarlos. Deben registrarse las actividades formativas en un formulario creado a tal efecto en el que figuren la fecha de inicio y de finalización de cada una, con la firma del personal en formación y del responsable de la misma.

Es obligatorio que todos los profesionales dedicados a los análisis citogenéticos sean miembros de sus respectivos colegios profesionales^(7,8).

2.6. Instalaciones y servicios

El lugar de trabajo debe disponer de la infraestructura necesaria para asegurar la calidad de los procedimientos. La organización debe proporcionar y mantener esta infraestructura y asegurar que cumple las normativas de seguridad ambiental y seguridad en el trabajo, según la directiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo⁽⁹⁾.

La infraestructura incluye: instalaciones y servicios asociados, equipos, soporte informático, transporte y tecnología de la información y comunicación.

2.6.1. Equipos

Todos los equipos del laboratorio deben cumplir con la Directiva 93/68/CEE⁽¹⁰⁾ y tienen que haber pasado una calibración y una evaluación del riesgo antes de su uso por los empleados.

Debe existir un inventario unificado de equipos propio de cada área del laboratorio con la siguiente información:

- Identificación.
- Tipo de equipo/Modelo.
- Número de serie.
- Fabricante o proveedor.
- Mantenimiento externo (contrato de mantenimiento).
- Fecha de alta.
- Procedimientos de trabajo asociados.
- Registro de averías.

Los equipos indispensables para el cultivo y el procesamiento de las muestras (cabina y vitrina de seguridad, incubador de CO₂, centrífuga, estufa, equipos de frío, baños) deberían existir por duplicado. Debe contarse con un plan de contingencia que indique cómo proceder en caso de avería de los mismos, así como en situaciones graves como el fallo del suministro eléctrico⁽⁶⁾.

Cabinas y vitrinas de seguridad

Según la Directiva 2000/54/CE⁽⁹⁾ se recomienda el uso de cabinas y vitrinas de seguridad. Las cabinas de seguridad biológica deben ser de clase II, tipo A1 (flujo laminar vertical) y seguir la normativa española⁽¹¹⁾. Asimismo, las vitrinas de extracción de gases deben seguir la normativa española^(12,13) de seguridad y funcionamiento.

Incubadores

Los incubadores idóneos para cultivos celulares son de CO₂ (5%) a 37 °C y 90% de humedad relativa. Deberán tener un sistema de control de temperatura y concentración de CO₂. Además, debe realizarse un mantenimiento interno rutinario y un protocolo de urgencia en caso de contaminación.

Centrífugas

Las centrífugas y microcentrífugas deben instalarse de forma que se eviten vibraciones en las muestras. Deben contar con un protocolo de limpieza periódica.

Procesadores y extensores automáticos

Actualmente, es posible automatizar las técnicas de extracción de los cultivos (lisis hipotónica, lavados y fijación), la realización de extensiones cromosómicas y la tinción de los cromosomas. Deberá realizarse un mantenimiento interno rutinario.

Hibridador para análisis de hibridación *in situ* fluorescente

El horno de hibridación o hibridador es un instrumento de codenaturalización e hibridación automático en el que es posible programar diversas temperaturas y tiempos para la técnica de FISH. Debe estar incluido en un programa de calibración y/o verificación de la temperatura.

Sistema de captura y análisis de imágenes para citogenética convencional e hibridación *in situ* fluorescente

El análisis de las imágenes puede realizarse directamente al microscopio. Sin embargo, es preferible su captura para la realización del cariotipo y los estudios de FISH y para poder archivarlas como un fichero digital. Dicha captura puede realizarse de manera manual o automatizada y en ambos casos son necesarios un microscopio adecuado y un sistema informático que procese toda la información.

- **Microscopios.** Se ha de disponer de una serie de microscopios adaptados para el análisis convencional y de FISH o al menos de uno que reúna las siguientes capacidades:
 - Microscopio óptico convencional de campo claro.
 - Microscopio óptico con contraste de fases.
 - Microscopio óptico de fluorescencia con filtros adecuados para la observación de los fluorocromos utilizados en el marcado de las sondas disponibles en el laboratorio.
- **Programa informático de captura, procesamiento y almacenamiento de imágenes.** Para la captura y el análisis de metafases y FISH se dispone de diferentes programas informáticos que, mediante cámaras asociadas al microscopio, realizan la captura de imágenes y el posterior procesado para simplificar el análisis al usuario. En el caso de la técnica de FISH, algunos programas también permiten realizar contajes en interfase de los patrones estipulados por los usuarios.

Se recomienda un mantenimiento externo para averías y actualizaciones del programa informático, así como un soporte técnico para asegurar el correcto almacenamiento y la recuperación de las imágenes procesadas. Se deberá establecer un protocolo para realizar copias de seguridad de las imágenes e informes en un dispositivo externo o en red de forma periódica (periodicidad a criterio de cada laboratorio).

La técnica de *microarrays* requiere de equipos específicos de la plataforma utilizada (*hardware* y *software*), además de aquellos recomendados por la casa comercial para realizar el protocolo técnico. Para el mantenimiento y la limpieza deben seguirse las indicaciones del fabricante. Es destacable que en muchos laboratorios de citogenética la técnica de *microarrays* genómicos se lleva a cabo en servicios externos o *core facilities*.

2.6.2. Mantenimiento

Se dispondrá de mantenimiento interno y externo.

Mantenimiento interno

El mantenimiento interno periódico de cabinas de seguridad e incubadores es indispensable para garantizar las condiciones estériles en la manipulación de la muestra y detectar contaminación microbiológica. El resto de los equipos también deben seguir las recomendaciones de limpieza del fabricante para un correcto funcionamiento.

Mantenimiento externo

Se recomienda contar con un servicio técnico de reparaciones propio y un contrato de mantenimiento periódico con los proveedores de los equipos. En caso de no ser posible dicho contrato, debe especificarse la periodicidad con que se solicitará el mantenimiento externo⁽⁶⁾.

La temperatura y la concentración de CO₂ de los incubadores, así como las temperaturas de estufas y equipos de frío deben estar controlados y registrados.

Dependiendo de cada centro, este proceso puede ser manual o a través de un sistema de sondas monitorizadas por un programa informático, donde se definan los márgenes de tolerancia de cada parámetro y se gestione un sistema de alarmas. Esto debe ir acompañado de un plan de contingencia en caso de avería. Cada equipo debe tener un registro propio donde se recojan las acciones de mantenimiento, averías y reparaciones, además de un procedimiento normalizado de instrumento (PNI) que sea revisado periódicamente.

2.7. Reactivos

2.7.1. Registro de reactivos

Debe existir un inventario de reactivos (que incluya mezclas y alícuotas) propio de cada área del laboratorio con la siguiente información:

- Identificación del producto.
- Número de lote y fecha de caducidad.
- Fecha de recepción y apertura.
- Responsable de la apertura o fabricación de la solución.
- Composición de la solución (relación de sustancias presentes y su concentración).

2.7.2. Ficha de seguridad

Según la normativa de prevención de riesgos laborales^(14,15), es obligatorio contar con la ficha de seguridad de cada producto siguiendo las guías sobre fichas de datos de seguridad y escenarios de exposición de la European Chemicals Agency (ECHA)⁽¹⁶⁾.

2.7.3. Almacenaje

El almacenaje dependerá de la peligrosidad intrínseca del producto, la ficha de seguridad, la cantidad a almacenar y las incompatibilidades entre productos según el Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST)⁽¹⁷⁾. Es recomendable almacenar los stocks de materiales inflamables en un armario ignífugo destinado para ello.

2.7.4. Medidas de prevención y protección

Se debe contar con las medidas de prevención y protección para los trabajadores y el medio ambiente según las legislaciones española y europea^(6,14-16,18). Se ha de contemplar el riesgo de accidente por incendio o explosión, el riesgo de accidente por toxicidad en caso de derrame y actuar según el protocolo interno del centro para asegurar al trabajador y al medio ambiente.

2.7.5. Sistema de gestión de residuos

Se realizará un tratamiento y una eliminación segura de los residuos según el etiquetaje y la ficha de seguridad del producto. También deben tratarse y eliminarse de forma segura los residuos biosanitarios que puedan provocar contaminación biológica (material cortante y/o punzante, envases con SP o MO)⁽¹⁹⁾.

Estos protocolos deberían estar incluidos en el documento de medidas de prevención y protección. La legislación española no dispone de normativas específicas sobre la gestión de residuos sanitarios, por lo que se aplica a estos efectos el régimen general⁽²⁰⁻²⁵⁾ y los protocolos específicos de cada comunidad autónoma.

Nota: al momento de la edición de esta guía, en el contexto de la pandemia por el virus SARS-CoV-2, se aconseja consultar las Recomendaciones del grupo GCECGH para el manejo de muestras hematológicas de pacientes COVID-19 positivos con neoplasias hematológicas destinadas a estudios citogenéticos, disponibles en el sitio web de la SEHH (<https://www.sehh.es/covid-19/recomendaciones>).

3. Fase analítica

3.1. Técnica de citogenética con bandas G

3.1.1. Conceptos básicos

- **Citogenética.** La citogenética es la parte de la genética que se dedica al estudio de los cromosomas, su estructura y herencia⁽²⁶⁾.
- **Cromosoma.** Un cromosoma es una estructura formada por ADN asociado a proteínas que contiene parte de la información genética de un organismo. El conjunto de cromosomas de un organismo contiene los genes característicos de la especie a la cual pertenece. Es en metafase donde el cromosoma adquiere la condensación adecuada para ser visualizado en un microscopio óptico.
- **Cariotipo.** Es la disposición ordenada de los cromosomas de un individuo según tamaño y patrón de bandas. El patrón de bandas más utilizado en citogenética es el de bandas G, que resulta en unas bandas más oscuras y otras más claras, que van entre 5 y 10 Mb y que incluyen centenares de genes. Las regiones oscuras son ricas en puentes de A-T, mientras que las bandas más claras son ricas en puentes de G-C y contienen más genes⁽²⁷⁾ (Figura 2).

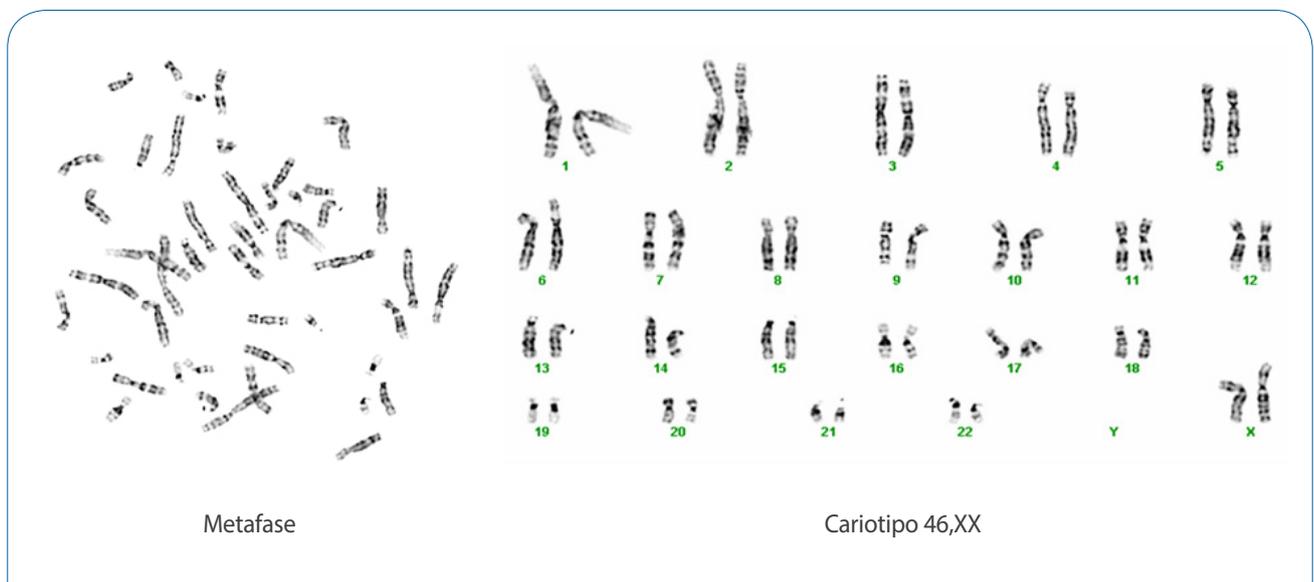


Figura 2. Imágenes que muestran una metafase y un cariotipo de sexo femenino con patrón de bandas G.

3.1.2. Descripción de la técnica de obtención de metafases

La técnica de citogenética fue introducida a finales de los años cincuenta y se basa en la obtención de cromosomas a partir de muestras biológicas. El proceso técnico se detalla a continuación y se muestra en la **Figura 3**.

Cultivo celular

Es necesario trabajar en condiciones estériles (las cabinas de seguridad biológica deben ser de clase II, tipo A1 (flujo laminar vertical)). La concentración celular en el cultivo debe ser de $2-3 \times 10^6$ células/mL. En muestras de MO recogidas con heparina sódica o litio se recomienda lavar la médula con medio de cultivo o de transporte (5 mL de medio, 1% de heparina) en tubo cónico, centrifugar y eliminar sobrenadante, sembrar en función del botón celular, así se elimina la grasa y se obtiene mejor calidad final. Se pueden realizar 1 o 2 cultivos con un volumen total de 5 o de 10 mL y utilizar medios de cultivo comerciales completos o realizar la mezcla en el laboratorio (75% RPMI-1640, 20% suero bovino fetal, 2% penicilina-estreptomicina, 2% L-glutamina, 1% heparina).

Se recomienda realizar el cultivo en una incubadora de CO₂ (5%) a 37 °C, también llamada incubadora de gasificación, ya que así se garantiza el desarrollo de cultivos celulares y de tejidos creando una atmósfera natural. El CO₂ compensa la acidificación del medio de cultivo como consecuencia de la división celular y la alta humedad del incubador impide la evaporación del medio de cultivo.

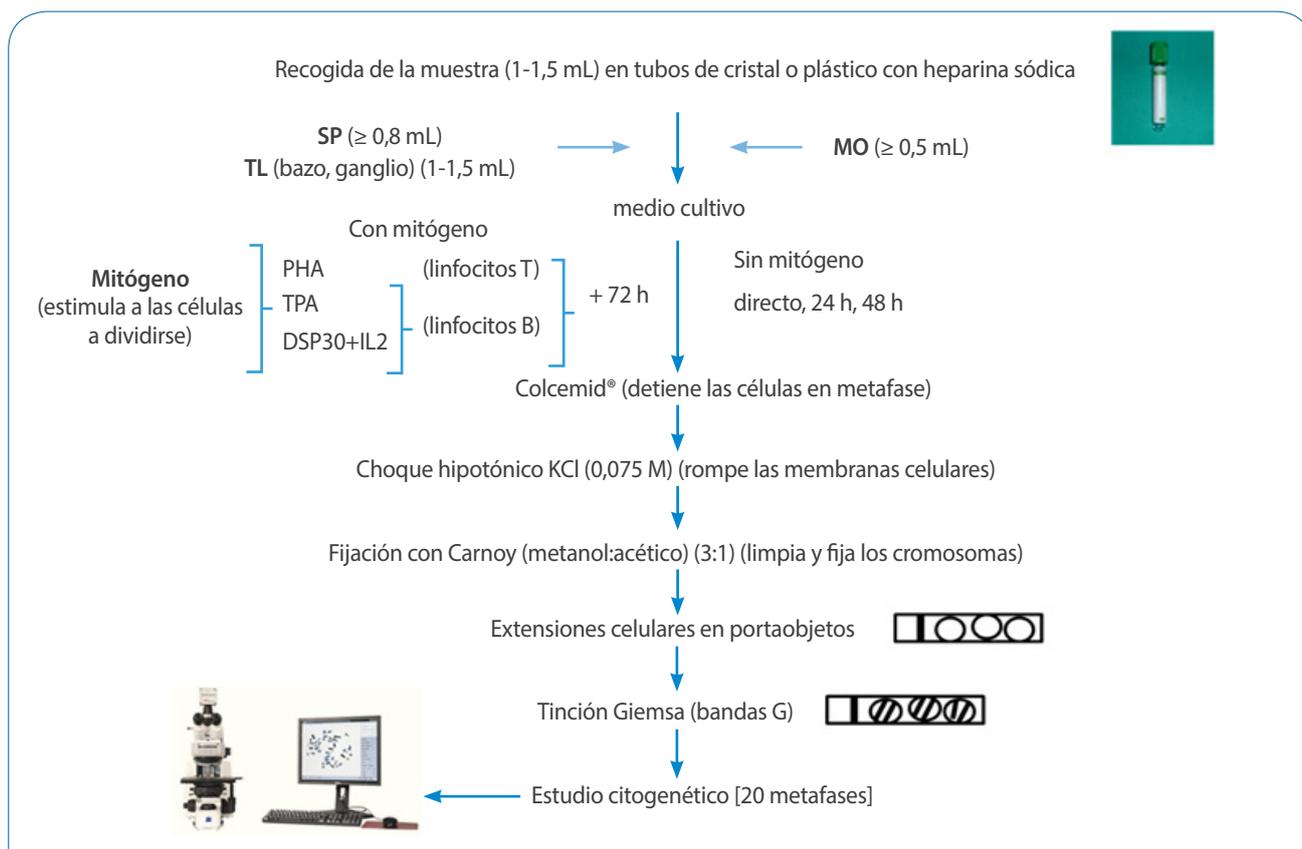


Figura 3. Esquema de la técnica de citogenética con bandas G. DSP30+IL2: CpG-oligonucleótido DSP30 e interleucina 2; MO: médula ósea; PHA: fitohemaglutinina; SP: sangre periférica; TL: tejido linfoide; TPA: forbol-12-miristato 13-acetato.

El tiempo de cultivo dependerá del estado madurativo de las células tumorales: en las muestras constituidas por células inmaduras con índice proliferativo alto el cultivo será de entre 4 y 24-48 horas y no será necesario el uso de mitógeno (fundamentalmente serie mieloide y leucemias agudas). No obstante, en aquellas muestras constituidas por células maduras (fundamentalmente, serie linfoide) el cultivo será de 72 horas y será necesario añadir un mitógeno al cultivo para estimular la división celular. Los mitógenos utilizados habitualmente son la fitohemaglutinina (PHA) para linfocitos T, el forbol-12-miristato-13-acetato (TPA) para linfocitos B y la combinación de interleucina 2 (IL-2) con el oligonucleótido CpG llamado DSP30 (CpG) para los pacientes con LLC (Tabla 3).

Tabla 3. Tiempos de cultivo, necesidad de mitógeno, cantidad y tiempo de Colcemid® orientativos según el tipo de neoplasia hematológica.

| Características del cultivo | Sospecha diagnóstica | | | | | |
|--|----------------------|--------------------------------|--|--------------|---------------|------------|
| | LA | SMD/NMP | MM | SLPC-B | LLC | SLPC-T |
| Tiempo de cultivo | Directo/Cultivo 24 h | Cultivo 24 h-48 h ^a | Cultivo 72 h/ Células CD138 ⁺ ^b | Cultivo 72 h | Cultivo 72 h | Cultivo 72 |
| Mitógeno | No | No | No | TPA | TPA; IL-2+CpG | PHA |
| Cantidad de Colcemid® (volumen de cultivo: 5 mL) | 50 µL | 50 µL | 50 µL | 50 µL | 100 µL | 200 µL |
| Tiempo de Colcemid® | 30' | 30' | 2 h | 2 h | 16-24 h | 30' |

^a Mielofibrosis; ^b es posible realizar cultivo de citogenética de células CD138+ aisladas por selección negativa

CpG: oligonucleótido CpG (DSP30); IL-2: interleucina 2; LA: leucemia aguda; LLC: leucemia linfática crónica; MM: mieloma múltiple; NMP: neoplasias mieloproliferativas; PHA: fitohemaglutinina; SLPC-B: síndrome linfoproliferativo crónico de células B; SLPC-T: síndrome linfoproliferativo crónico de células T; SMD: síndromes mielodisplásicos; TPA: forbol-12-miristato-13-acetato

Parada de la división celular

Una vez pasado el tiempo de cultivo, se obtiene un máximo de células en división (metafases). En este momento, se añade Colcemid® (colchicina, antimitótico), que actuará durante un tiempo establecido despolimerizando los microtúbulos del huso mitótico, responsables de separar las cromátides de un cromosoma, y bloqueando la división. Cuanto más tiempo actúe el antimitótico, más metafases se obtendrán, pero más cortos serán los cromosomas; con menos tiempo de actuación, se obtendrán menos metafases, pero con cromosomas más largos. La cantidad y el tiempo de Colcemid® recomendados según el tipo de neoplasia hematológica se detallan en la **Tabla 3**. No obstante, cada laboratorio debe estandarizar los tiempos.

Choque hipotónico

Tras el cultivo celular, las células son sometidas a un choque hipotónico con cloruro potásico (KCl 0,075 M). Se recomienda que la solución hipotónica para el choque hipotónico esté previamente calentada a 37 °C. Es importante resuspender siempre el *pellet* celular antes de introducir el hipotónico, que en un inicio se añadirá gota a gota. Los tiempos de incubación serán variables según cada laboratorio y pueden oscilar entre 20 o 30 minutos en baño a 37 °C.

El choque hipotónico por acción de ósmosis hace que la membrana citoplasmática se tense y que los cromosomas de aquellas células que están en metafase empiecen a separarse entre ellos. Es un paso delicado, ya que si el hipotónico actúa demasiado tiempo las membranas se rompen, obteniéndose metafases incompletas o muy dispersas (sopa cromosómica). Si, por el contrario, el hipotónico no actúa lo suficiente, tendremos ovillos de metafases.

Fijación con solución de Carnoy

Al finalizar la acción del hipotónico se pueden añadir opcionalmente 10 gotas de fijador de Carnoy (3 metanol:1 ácido acético glacial) para fijar las células. Posteriormente, se realizará centrifugación y, seguidamente, los lavados con fijador de Carnoy hasta que el *pellet* celular quede limpio. En cada lavado con fijador se debe llenar el tubo de centrifuga como mínimo hasta los 10 mL. La función del fijador es lisar los hematíes, romper las membranas citoplasmáticas, fijar los cromosomas y, finalmente, con los diferentes pases de fijador, eliminar membranas, citoplasmas y diferentes organelas para obtener un *pellet* con los núcleos en interfase y metafases.

Extensiones, envejecimiento y tinción

Las extensiones deben realizarse con una dilución ajustada y condiciones de humedad y temperatura adecuadas para conseguir que los cromosomas queden adecuadamente separados. El envejecimiento (paso necesario para obtener las bandas cromosómicas) varía entre laboratorios, pudiendo ser por calor (1 hora a 100 °C o 24 horas a 60 °C) o con una dilución de agua oxigenada. A continuación, para la tinción de las extensiones debe realizarse un tratamiento previo con tripsina o 2 × SSC (65 °C; 1-3 min). El objetivo es romper los 2 puentes entre A-T, más frágiles que los 3 puentes de G-C. Al romperse los enlaces A-T se facilita que la tinción penetre en la estructura del cromosoma rica en secuencias de A-T (bandas oscuras). Para la tinción de las extensiones se utiliza, generalmente, colorante Wright o Giemsa.

3.1.3. Recomendaciones para el análisis cromosómico

Las recomendaciones que se detallan a continuación se basan en las guías europeas *European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms*⁽²⁸⁾.

Estudios al diagnóstico

El análisis citogenético en el momento del diagnóstico debe realizarse en un mínimo de 20 metafases, 10 completamente analizadas y 10 contadas o analizadas rastreando la alteración citogenética relevante en cada patología. Si no se detecta una anomalía cromosómica, se puede descartar la presencia de un clon (**Tabla 4**) cromosómicamente anómalo en un porcentaje mayor al 14% de las células (con un intervalo de confianza del 95%)⁽²⁹⁾.

En caso de no tener crecimiento u obtenerse menos de 20 metafases analizables se recomienda repetir el estudio, pero si se decide informar un resultado normal en función del análisis de menos de 20 metafases, en el informe debe reflejarse que el análisis no puede descartar la presencia de un clon cromosómicamente anómalo. Si se encuentra una anomalía cromosómica clonal, debe analizarse un mínimo de 10 metafases, aunque es recomendable intentar estudiar siempre 20 metafases por si existen subclones⁽²⁸⁾.

Tabla 4. Definición de los términos para las anomalías cromosómicas relacionadas con neoplasias (International System for Human Cytogenetic Nomenclature –ISCN–, 2020).

| Término | Descripción | Ejemplo |
|-------------------------------------|---|--|
| Clon | Un clon es una población celular que se origina a partir de una única célula progenitora. Anomalía clonal: si es ganancia o anomalía estructural debe encontrarse en ≥ 2 metafases; si es una pérdida debe encontrarse en ≥ 3 metafases | 45,XX,-5,del(7)(q23q31)[2]/46,XX[18] Clon que presenta una monosomía del cromosoma 5 y una deleción intersticial del cromosoma 7 en 2 metafases. En 18 metafases el cariotipo es normal |
| Subclon | Es el clon relacionado citogenéticamente con el clon primario (<i>stemline</i> –sl–). El término <i>idem</i> puede utilizarse para describir subclones y se refiere siempre a la anomalía primaria | a) 46,XX,del(7)(q31)[3]/47,sl,+8[17]/48,sl1,+9[3]/49,sl2,+11[12] b) 46,XX,del(7)(q31)[3]/47,idem,+8[17]/48,idem,+8,+9[3]/49,idem,+8,+9,+11[12] |
| Línea principal (<i>mainline</i>) | Es la constitución cromosómica más frecuente de un tumor | 46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[3]/47,idem,+8[17] El clon de 47 cromosomas representa la línea principal |
| Número modal | Es el número cromosómico más común en una población tumoral | <ul style="list-style-type: none"> Haploide (n); diploide (2n); triploide (3n); tetraploide (4n) Próximo a la diploidía (46+/-):35-57; Hipodiploide (2n-):35-45; hiperdiploide (2n+): 47-57 |
| Anomalía cromosómica primaria | Es de presentación única. Suele estar asociada a un tipo de tumor específico | t(11;14)(q13;q32) en linfoma del manto t(12;21)(p13;q22) en leucemia aguda linfoblástica B (LAL-B) |
| Anomalías cromosómicas secundarias | Aparecen en células portadoras de una anomalía primaria, raramente se presentan como únicas y dependen del tipo de anomalía primaria y del tipo de neoplasia | del(17p) en linfomas, LAL, síndromes mielodisplásicos, leucemia aguda mieloide, mieloma múltiple (MM) dup(1q) en MM |

En algunas neoplasias, por ejemplo en los SMD, la evolución clonal confiere un diagnóstico desfavorable⁽³⁰⁾ y puede determinar una estratificación pronóstica diferente⁽³¹⁾. Se recomienda realizar el análisis cromosómico por 2 observadores y es importante analizar metafases de buena y de mala calidad, ya que es frecuente que la alteración cromosómica se encuentre en las segundas, sobre todo en las LA. Respecto a la complejidad cromosómica, clásicamente se define el cariotipo complejo como la presencia de 3 o más alteraciones en un único clon. No obstante, esta definición está relacionada con el pronóstico y, por esta razón, la suma de alteraciones para definir un cariotipo complejo puede variar en función de la patología (Tabla 5).

Tabla 5. Definición de cariotipo complejo en distintas neoplasias hematológicas.

| Patología | Cariotipo complejo | Pronóstico | Referencia |
|------------------|---|----------------------------------|------------------------------------|
| LAL | ≥ 5 anomalías | Desfavorable | Moorman et al. Haematologica. 2016 |
| LLC | ≥ 3 anomalías ^a con TP53mut/del ≥ 5 anomalías | Desfavorable | Baliakas et al. Blood. 2019 |
| LAM | > 3 anomalías | Desfavorable | Döhner et al. Blood. 2017 |
| SMD ^b | 3 anomalías > 3 anomalías | Desfavorable Muy desfavorable | Greenberg et al. Blood. 2012 |

^a En LLC, un cariotipo complejo (CC) con 3 anomalías no siempre es sinónimo de mal pronóstico, habría que excluir los CC con +12, +19, +otros, de curso indolente. Según Baliakas (2019), solamente el CC con ≥ 5 alteraciones tiene un valor pronóstico independiente; ^b en SMD el CC se define como 3 o más alteraciones en un clon o 3 o más alteraciones en 2 subclones no relacionados

LAL: leucemia aguda linfoblástica; LAM: leucemia aguda mieloide; LLC: leucemia linfocítica crónica; SMD: síndrome mielodisplásico

Finalmente, es importante recordar que, cuando se sospecha que una alteración cromosómica puede ser de origen constitucional, se aconseja analizar metafases adicionales para poder identificar el clon normal. Si el origen constitucional no se puede descartar en la muestra tumoral analizada, debe realizarse el estudio citogenético en otro tejido, habitualmente SP estimulada con PHA.

Estudios en el seguimiento de la enfermedad

El estudio citogenético en pacientes en seguimiento clínico vendrá condicionado por los hallazgos del estudio al diagnóstico. En aquellos casos con una alteración citogenética identificada al diagnóstico deben estudiarse como mínimo 10 metafases. En aquellos casos en que el cariotipo al diagnóstico es normal no está indicado realizar un cariotipo en el seguimiento y menos aún si se dispone de información de citometría de flujo o técnicas moleculares que corroboren la ausencia de enfermedad.

No obstante, si la información clínica sugiere una recaída, una enfermedad refractaria o una segunda neoplasia hematológica, está indicado repetir el estudio citogenético y las muestras deben procesarse como se describe para las muestras de diagnóstico.

En función de la alteración detectada al diagnóstico, puede realizarse una determinación de FISH durante el seguimiento. Esto es válido para la fase postratamiento, pre- y postrasplante. En el último supuesto puede tener interés realizar el cariotipo si el donante es de diferente sexo, aunque es preferible la detección de quimerismo mediante biología molecular. En los casos de SMD o NMP siempre debe realizarse seguimiento citogenético para valorar una posible evolución clonal (Tabla 6).

Tabla 6. Estudios citogenómicos recomendados en el seguimiento de la enfermedad según la fase y el tipo de neoplasia hematológica.

| Técnica de análisis | Cariotipo | FISH |
|--|---------------------|-----------------|
| Seguimiento postratamiento o en remisión | | |
| LAL/LAM | | |
| • EMR negativa por citometría de flujo o técnicas moleculares | No ^a | No ^a |
| • EMR no se realiza por citometría de flujo o técnicas moleculares | Sí | Sí |
| SMD/NMP (descartar evolución clonal) | Sí | Sí ^b |
| LMC | Sí (3, 6, 12 meses) | Sí ^c |
| Pretrasplante | Sí | Sí ^b |
| Postrasplante | | |
| Cariotipo alterado pretrasplante y/o donante de diferente sexo | Sí | Sí ^b |
| Recaída/Transformación/Neoplasia secundaria (repetir los estudios del diagnóstico) | Sí | Sí |

^a No procede hacer el estudio citogenético independientemente del cariotipo al diagnóstico. Se recomienda establecer el cultivo solo si se sospecha de una segunda neoplasia; ^b FISH dirigida si tenía alteración previa al diagnóstico; ^c si no se obtienen metafases

EMR: enfermedad mínima residual; FISH: hibridación *in situ* fluorescente; LAL: leucemia aguda linfoblástica; LAM: leucemia aguda mieloide; LMC: leucemia mieloide crónica; NMP: neoplasia mieloproliferativa; SMD: síndrome mielodisplásico

3.1.4. Ensayo de inestabilidad cromosómica en linfocitos de sangre periférica

Ante la sospecha clínica de una AF, está indicado realizar el ensayo de inestabilidad cromosómica. Dicho ensayo se basa en la hipersensibilidad específica de las células de estos pacientes a los agentes inductores de enlaces cruzados en la cadena de ADN. El diepoxibutano (DEB) es el agente preferentemente utilizado por su elevada sensibilidad y especificidad, ya que otros agentes tienen un índice mayor de falsos positivos y falsos negativos⁽³²⁾.

Descripción de la técnica

A partir de una muestra de SP del paciente a estudiar y de un control negativo sano (recomendable si no se realiza este tipo de estudio de forma rutinaria) se establecen 3 cultivos por muestra, con un volumen final de 5 mL cada uno: 0,5 mL de SP + RPMI + 15% de suero bovino fetal + 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina + 1% de L-glutamina + 1% de PHA. A las 24 horas se tratan 2 de los cultivos con 0,1 µg/mL de DEB (**Figura 4**). Esta concentración ha sido valorada como diagnóstica en este test y en SP.

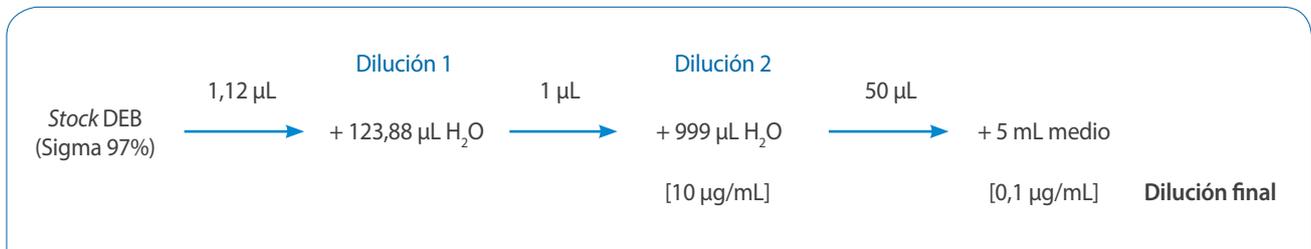


Figura 4. Preparación de la concentración diagnóstica de diepoxibutano (DEB). **Nota:** Se prepara la solución de DEB a partir del *stock* de DEB con agua destilada esterilizada. Se recomienda cambiar el *stock* cada 6 meses para asegurar su mecanismo de acción.

De los 2 cultivos con DEB, uno va a ser del paciente y el otro del control sano. El cultivo restante será utilizado como control de daño espontáneo en el paciente.

Se incuban entre 48 y 72 horas más y 2 horas antes de la extracción se añade Colcemid® a una concentración de 0,1 µg/mL. A continuación, se procede a la extracción de los cultivos de manera similar a la obtención de cariotipos: tratamiento con hipotónico KCl 0,075 M a 37° durante 25 minutos, primera fijación con Carnoy y 1 o 2 lavados más, en función del botón celular.

De todos modos, cada laboratorio puede adaptar el protocolo para optimizar la obtención de un mayor número de metafases y de mayor calidad. Lo importante es que, una vez establecido, se siga siempre el mismo procedimiento.

Los *pellets* fijados se preservan a 4 °C y se extienden sobre un portaobjetos en el momento en el que se desea hacer el estudio. La tinción será uniforme para poder visualizar mejor las roturas. Puede hacerse con colorante Giemsa.

Estudio de inestabilidad cromosómica

Las preparaciones se estudiarán al microscopio óptico a ciegas, sin conocer si el cultivo en estudio corresponde al espontáneo o al tratado. Se analizan 25/50 metafases por cultivo y se registra el número de roturas observadas en cada metafase, el tipo de aberraciones, cromosómicas y cromatídicas, y el número de figuras. En el recuento final, la figura se traducirá por el número de roturas cromatídicas/cromosómicas necesarias para formar la misma. A partir de este recuento, se calculan varios índices que serán posteriormente utilizados en la valoración:

- Roturas por célula.
- Porcentaje de células con roturas (células aberrantes).
- Porcentaje de células con 2 o más roturas (células multiaberrantes).
- Roturas/Célula aberrante.
- Roturas/Célula multiaberrante.
- Número de figuras.

Un paciente se considera afecto de AF cuando se observa un incremento significativo de roturas en las células tratadas con DEB en comparación con las células no tratadas del mismo paciente y con los resultados en individuos sanos no afectados de AF. Las roturas cromatídicas y la presencia de figuras son características de pacientes con esta enfermedad⁽³³⁾.

El porcentaje de células aberrantes puede variar mucho entre pacientes. Una mayoría de pacientes tiene un porcentaje por encima del 60%, pero en otros pacientes podemos ver entre un 10 y un 40% de células aberrantes y

los clasificaríamos como mosaicos. Son pacientes afectados de AF, pero que tienen 2 subpoblaciones de células en SP: una con fragilidad cromosómica y otra que no presenta fragilidad debido a la reversión espontánea en uno de los alelos⁽³⁴⁾. Los pacientes con entre el 40 y el 60% de células aberrantes se considerarían posibles mosaicos. En la literatura se ha descrito que un 18-25% de los pacientes con AF podrían ser mosaicos^(35,36).

El punto crítico de este ensayo sería la discriminación de mosaicos muy revertidos con pacientes no AF. En este sentido, Castellà *et al.*⁽³⁶⁾ definieron el índice de fragilidad cromosómica (CFI), que se calcula multiplicando el porcentaje de células aberrantes por el número promedio de roturas en las células multiaberrantes, ya que las células multiaberrantes, en estos pacientes, mantienen un número elevado de roturas. Valores superiores a 54 de este índice nos indicarían que el paciente tiene AF.

De todos modos, aunque este índice puede ser orientativo en pacientes con valores inferiores al 10% de células aberrantes, se tendrían que confirmar con el ensayo en fibroblastos.

Ante un test negativo, si el especialista mantiene sus sospechas de la enfermedad, convendrá descartar en la medida de lo posible que se trate de un paciente afecto de AF con mosaicismo somático totalmente revertido en sangre. Si es necesario, se deberá realizar el test en fibroblastos obtenidos de biopsia de piel.

3.2. Técnica de hibridación *in situ* fluorescente

3.2.1. Conceptos básicos

La técnica de FISH se basa en la capacidad que tiene el ADN de cadena sencilla de unirse a una cadena complementaria. Para poder desarrollar esta técnica son necesarios 2 requisitos:

- Disponer de una muestra problema con morfología celular preservada y conservada sobre un portaobjetos.
- Disponer de un fragmento de ADN, que denominamos sonda, marcado con fluorescencia y que sea complementario a la región genómica que se desea estudiar. El tamaño mínimo de las regiones diana para ser detectadas al microscopio es aproximadamente de 70-100 kb.

La detección de señales fluorescentes de la región genómica estudiada sobre la muestra analizada permite detectar alteraciones tanto numéricas como estructurales sobre metafases, núcleos en interfase, células individualizadas o cortes de tejido.

3.2.2. Tipos de muestras y de sondas

Tipos de muestra. Especificaciones para la técnica de hibridación *in situ* fluorescente

- **Tejido fresco.** Muestras de SP, MO (debería proceder de la primera aspiración medular), ganglio linfático, bazo, otros tejidos con infiltración tumoral o bien otros líquidos biológicos.
 - Suspensión celular: muestra en fresco (líquido o disgregado tisular) fijada con Carnoy.
 - Extensiones celulares: muestra extendida sobre un portaobjetos como las extensiones citológicas convencionales, citocentrífugas (CitoSpin®), improntas, etc. Es necesaria una fijación al portaobjetos con metanol o con Carnoy.
 - Poblaciones celulares purificadas.
- **Muestra procedente de cultivo de citogenética.** Una vez concluido el cultivo y el procesamiento de extracción para citogenética, los núcleos en suspensión (en metafase e interfase) fijados en Carnoy se extienden sobre un portaobjetos. Se debe tener en cuenta que el cultivo *in vitro* puede alterar la proporción de células tumorales presentes en la muestra.
- **Tejido parafinado.** La técnica se realiza sobre cortes de tejido de 3-4 µm de grosor en portaobjetos pretratados/cargados positivamente para evitar que el tejido se desprenda del portaobjetos durante el procesado. Se requiere eliminación de la parafina del tejido con calor (estufado) y con xilol. El protocolo técnico y la interpretación son más dificultosos. Es imprescindible el trabajo en conjunto genetista/patólogo para definir la localización del área tumoral.

Tipos de sondas

Sondas de *locus* específico o secuencia única

Hibridan con el ADN de una región genómica concreta (única), correspondiente a un gen o a una banda cromosómica. Permiten detectar alteraciones numéricas (deleciones o amplificaciones) y estructurales, en función del diseño de la sonda, tanto en metafases como en núcleos interfásicos.

Para la detección de reordenamientos cromosómicos se utilizan comúnmente 2 tipos de sondas de *locus* específico:

- **Sondas de doble fusión o *dual fusion* (DF).** Se utilizan para detectar translocaciones cromosómicas y aportan información sobre los 2 genes implicados en el reordenamiento. Los mismos están marcados con 2 fluorocromos distintos. Cuando la muestra presenta un reordenamiento se observan, además de 2 señales normales (una señal de cada color, en los cromosomas no reordenados), un patrón de 2 fusiones debido a la colocalización de las señales.

Esta fusión puede generar un tercer color: por ejemplo, cuando usamos sondas marcadas en rojo y verde se puede observar un color amarillo como resultado de la fusión. Permiten visualizar los reordenamientos tanto en metafase como en núcleos en interfase. El diseño de estas sondas permite descartar falsos positivos por colocalización de señales debido al azar.

- **Sondas de rotura o *break apart* (BA).** Están constituidas por 2 sondas *locus* específicas marcadas con 2 fluorocromos distintos que flanquean un gen diana involucrado en un reordenamiento (translocación, inversión). En una muestra positiva observaremos una de las parejas de señales, marcadas con fluorocromos distintos, separadas.

Son muy útiles para el estudio de reordenamientos en los que los genes diana presentan múltiples posibles *partners* (parejas de reordenamiento, por ejemplo: *KMT2A*, *ABL1*, *BCL6* o *IGH*). Permiten su visualización tanto sobre metafases como en núcleos en interfase.

Sondas centroméricas

Hibridan con el ADN de la región centromérica y/o pericentromérica (heterocromatina) de un cromosoma concreto. Permiten la detección de aneuploidías (ganancias o pérdidas de cromosomas enteros) en metafase o núcleos en interfase.

Sondas de pintado cromosómico

Formadas por una batería de sondas de *locus* específico que en su conjunto hibridan con un cromosoma concreto entero (solo la eucromatina, no la región centromérica). Se pueden utilizar sondas para un único cromosoma o, mediante la combinación de distintos fluorocromos, sondas que permitan realizar un cariotipo espectral de todos los cromosomas (SKY o M-FISH).

Permiten visualizar alteraciones citogenéticas numéricas y estructurales sobre metafases, pero no es posible analizar estas sondas sobre núcleos en interfase. Son de gran utilidad para confirmar de forma inequívoca cariotipos con translocaciones complejas o con cromosomas marcadores, especialmente cuando los cromosomas son de mala calidad. No son, en cambio, apropiadas para el estudio de inversiones o pequeñas deleciones.

Los patrones de comportamiento clásico para todos los tipos de sonda se describen en la Figura 5.

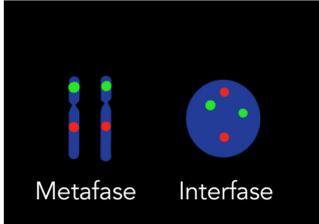
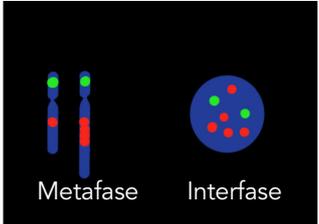
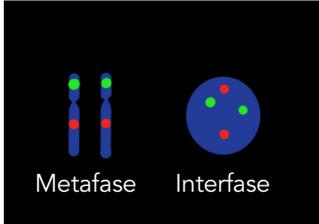
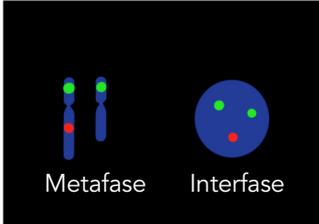
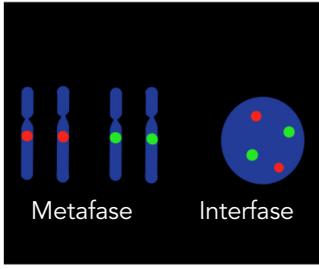
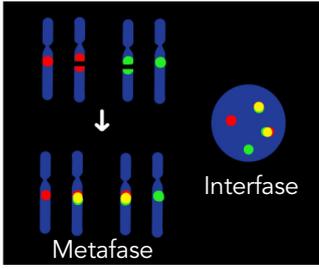
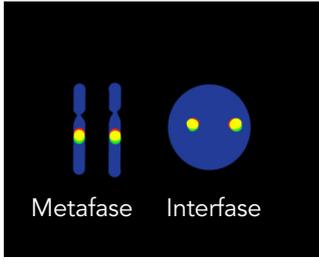
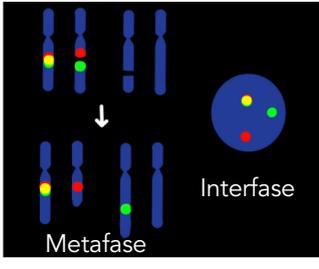
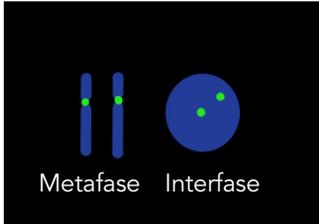
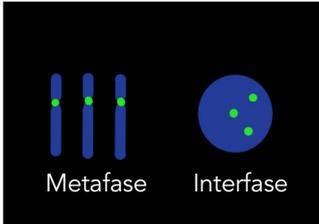
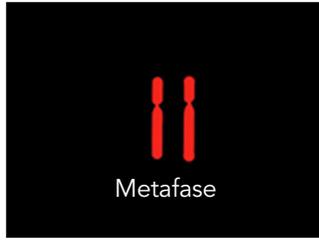
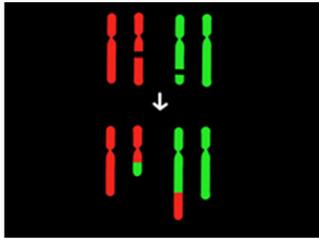
| | | Modelo de célula normal | Modelo de célula aberrante |
|--|---|--|--|
| Sondas específicas de locus o sondas de secuencia única | Amplificación o ganancia de gen |  Metafase Interfase |  Metafase Interfase |
| | Delección o pérdida de gen |  Metafase Interfase |  Metafase Interfase |
| | Reordenamientos con sondas de doble fusión |  Metafase Interfase |  Metafase Interfase |
| | Reordenamientos con sondas de separación (break apart) |  Metafase Interfase |  Metafase Interfase |
| Sondas centroméricas |  Metafase Interfase |  Metafase Interfase | |
| Sondas de pintado cromosómico Usadas únicamente en el estudio en metafases |  Metafase |  Metafase | |

Figura 5. Patrones de hibridación clásicos de los distintos tipos de sondas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Imagen cedida por cortesía de Roser Moret.

3.2.3. Procedimiento técnico

Fijación de la muestra

Tiene como función la preservación del ADN y de la morfología de la muestra (cromosomas, núcleos, células o cortes de tejido). En el caso de los tejidos sólidos, es importante, además, que la fijación de la muestra en fresco se realice lo antes posible (1-3 horas después de la obtención). La fijación es un paso clave para obtener buenos resultados.

Se utilizan distintos fijadores dependiendo del tipo de muestra:

- **Células en suspensión y procedentes del cultivo de citogenética convencional:** se usa el fijador Carnoy, que está especialmente indicado para preservar ácidos nucleicos.
- **Extensiones celulares/Improntas:** fijación por precipitación sobre el portaobjetos con etanol o metanol.
- **Tejido sólido en fresco:** fijación por entrecruzamiento con formol (solución acuosa de formaldehído al 40%). Para muestras de tejido se recomienda ajustar el tiempo de fijación al tamaño de la muestra (6-48 horas), ya que una fijación prolongada afecta a la calidad del ADN.

Es **importante** evitar fijadores que contengan mercurio (Hg) o ácidos, dado que estos degradan el ADN e impiden una hibridación óptima de las sondas de FISH (**Figura 6**).

Pretratamiento

Tiene como función aumentar la accesibilidad de la sonda al ADN de la muestra digiriendo las estructuras tisulares extracelulares y permeabilizando las membranas celulares y nucleares. En esta etapa se incrementa la eficiencia de la hibridación y se minimizan las uniones inespecíficas. Dependiendo del tipo celular y tisular, utilizaremos pretratamientos más o menos agresivos.

Para muestras con células en suspensión (células plasmáticas –CP– aisladas, linfocitos o granulocitos) se recomienda pretratamiento corto con pepsina. En tejidos, para la recuperación antigénica utilizaremos tampones EDTA o citrato a temperatura elevada, y pretratamientos con proteasas para la posterior digestión enzimática (pepsina, proteinasa K). Para otro tipo de muestras (procedentes de cultivo celular, improntas...) no es necesario pretratar.

Desnaturalización

La desnaturalización es la separación de las cadenas de la doble hélice del ADN para permitir la hibridación con la sonda complementaria. Para ello, sometemos la muestra y la sonda a una temperatura elevada, de 73 a 90 °C, los tiempos descritos por cada casa comercial según el tipo de sonda y el tipo de muestra. Para tejidos seccionados suele ser necesario aumentar el tiempo y la temperatura de desnaturalización. Las sondas comerciales están diluidas con una solución tampón que contiene formamida, solvente orgánico que permite preservar la morfología nuclear a temperaturas elevadas.

Hibridación

Es el proceso por el cual el ADN de la sonda se une con el ADN de la muestra por complementariedad de bases. Esto se consigue a una temperatura de 37-45 °C y habitualmente se realiza durante toda la noche (*overnight*). Existen protocolos rápidos con tampones especiales que permiten hibridaciones rápidas con tiempos de incubación de entre 2 y 4 horas.

Lavados de post-hibridación

Se realizan para eliminar el exceso de sonda que no se ha unido con el ADN de la muestra problema y las señales inespecíficas (híbridos no perfectos que generan ruido de fondo). Los lavados consisten en soluciones salinas en condiciones astringentes (0,4 × SSC y 2 × SSC) junto con el uso de detergentes (NP-40® o Igepal®).

Contratinción

Permite visualizar el fondo de la preparación, es decir, la cromatina (los cromosomas y los núcleos interfásicos) y así poder observar dónde se localizan las señales de hibridación. El fluorocromo más utilizado es el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que se une al ADN, especialmente a regiones enriquecidas en adenina y timina.

El esquema básico de la técnica FISH se describe en la Figura 6.

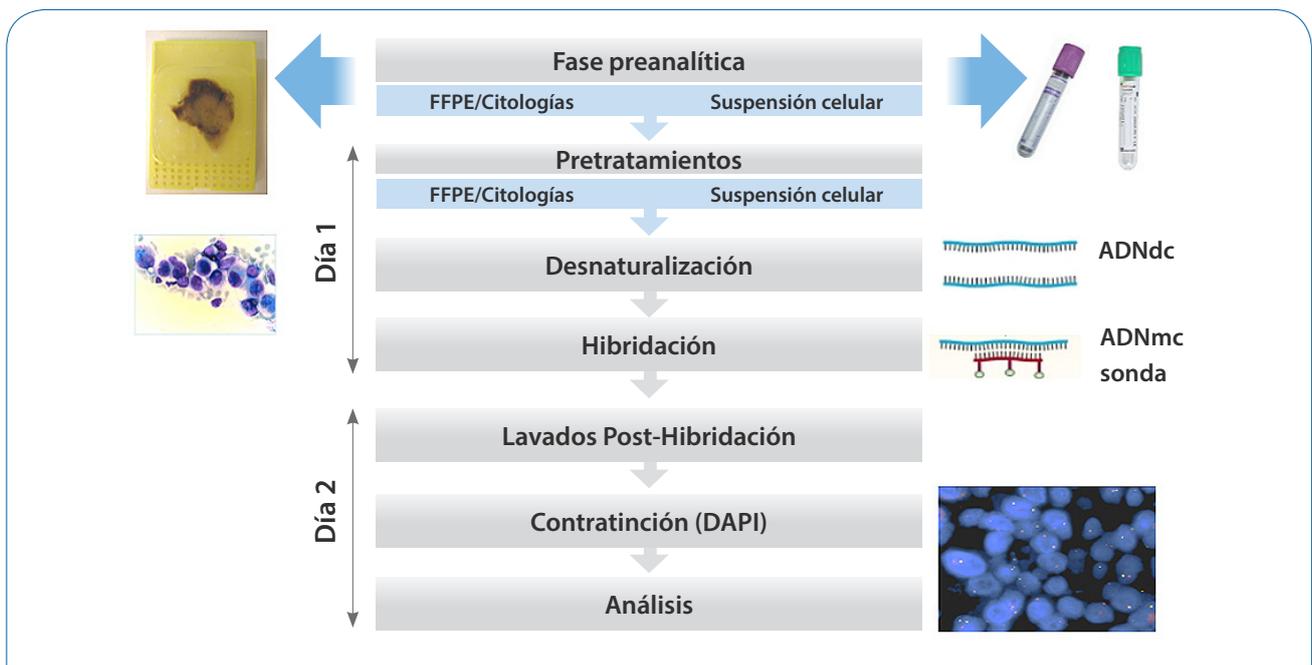


Figura 6. Esquema de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol; FFPE: *formalin-fixed paraffin-embedded*.

En algunos casos, será necesario purificar poblaciones celulares para aumentar la sensibilidad de la técnica de FISH.

- **Separación de CP** para el estudio de alteraciones genéticas en pacientes con discrasias de CP. La selección de CP en muestras de MO permite aumentar la sensibilidad de la técnica FISH. Recomendaciones técnicas:
 - La muestra debería enviarse lo antes posible, teniendo en cuenta que el procesamiento es largo y la estabilidad de las CP es reducida (si no se transportan ni conservan a 4 °C).
 - Existen 2 metodologías para la separación de CP:
 - **Selección positiva:** separación inmunomagnética (MACS) mediante el anticuerpo anti-CD138 que se une específicamente a las CP.
 - **Selección negativa:** uso de una combinación de anticuerpos monoclonales (CD2, CD14, CD33, CD41, CD45RA, CD66b) y antiglicoforina A, que se unen a la fracción no deseada. Posteriormente, se recoge la fracción positiva de CP mediante centrifugación con Ficoll® o gradiente de densidad. En caso de purificación por selección negativa, es posible cultivar las CP obtenidas y realizar posteriormente el protocolo de citogenética convencional.

Una vez obtenidas las CP purificadas de MO, se incuban con una solución hipotónica (KCl) y se fijan con Carnoy. Para optimizar el uso de este material es recomendable realizar extensiones del material fijado con citocentrífuga (CitoSpin®).

- **Separación de granulocitos de SP para el estudio de alteraciones genéticas de las NMP con eosinofilia.** Permite mejorar la sensibilidad de la técnica FISH para la detección de los reordenamientos *FIP1L1-PDGFR*, *PDGFRB*, *FGFR1* y *JAK2*. Se basa en la separación celular por gradiente de densidad utilizando Ficoll® y dextrano. Para ello, se utilizan centrifugas convencionales. Una vez recogida la fracción de granulocitos, se incuban con una solución hipotónica (KCl) y se fija con Carnoy para su posterior extensión en un portaobjetos, previa al estudio de FISH.

3.2.4. Análisis y evaluación de la competencia

El análisis de la técnica de FISH es el procedimiento por el cual se valora el resultado de la técnica y que permite emitir un informe final. Para ello, se utiliza un microscopio óptico de fluorescencia (observación manual o automatizada). Los criterios de análisis dependerán de:

- **Tipo de muestra:** núcleos en suspensión vs. tejido sólido. En general, para muestras en suspensión/extensiones analizadas al diagnóstico es suficiente con un recuento de 100 núcleos. En estudios en seguimiento, se recomienda el análisis de un mínimo de 200 núcleos. Para tejido en parafina, siempre que sea posible y los núcleos estén bien delimitados, se recomienda analizar 100 núcleos dentro del área tumoral previamente marcada en el portaobjetos. No obstante, en este tipo de muestra, dada la dificultad de hacer un recuento de núcleos (infiltración en sábana), se puede realizar una estimación del porcentaje de núcleos con alteraciones mediante la visualización a 100× de múltiples campos dentro de la región tumoral marcada.
- **Tipo de sonda y alteración genética a estudiar.** Para el análisis de las sondas debemos tener en cuenta:
 - El diseño de la sonda: BA o DF.
 - El punto de corte o *cut-off* para considerar un caso como positivo (véanse los apartados *Cálculo de cut-off o punto de corte de células aisladas* y *Cálculo de cut-off para cortes de tejidos incluidos en parafina*).
 - El patrón de normalidad/patrón anómalo. Es importante tener en cuenta que en las sondas BA se considera que las señales están separadas cuando entre ellas hay una distancia superior a 2 veces el diámetro de la señal⁽³⁷⁾, aunque la experiencia del observador determinará la posible presencia de una alteración cromosómica, pues la distancia entre señales puede variar según tipo de sonda y muestra.
- **Tipo de análisis:** manual vs. automatizado. Cuando se implante un sistema de análisis automatizado se deberá validar respecto al resultado obtenido con la técnica manual. Es importante remarcar que los puntos de corte de positividad suelen ser más altos con el sistema automático.

En las **Tablas 7 y 8** se muestran los criterios de análisis en función del tipo de sonda y la patología, y en la **Tabla 9** se recogen los criterios de análisis en función del tipo de muestra y la patología. No obstante, es necesario que cada laboratorio los establezca en función del tipo de sonda y del tipo de muestras que recibe.

Tabla 7. Criterios de análisis de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en células en **suspensión** en función del tipo de sonda*.

| Tipo de sonda | Número mínimo de células analizadas | Punto de corte |
|-----------------------------------|-------------------------------------|--|
| Sondas centroméricas | 100 núcleos interfase | Monosomía ≥ 10% |
| | | Trisomía ≥ 5% |
| Sondas de <i>locus</i> específico | 100 núcleos interfase | Deleción (con sonda control) ≥ 5% |
| | | Ganancia ≥ 5% |
| | | Reordenamiento ≥ 1-5% |
| Sondas de pintado cromosómico | 10 metafases | Mínimo 2 metafases con la misma alteración |

* Los datos que se muestran en esta tabla son valores aproximados y se obtienen de la experiencia personal de los autores del presente documento. Es recomendable que cada centro calcule sus propios puntos de corte de positividad para cada tipo de sonda

Tabla 8. Criterios de análisis de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en **tejido parafinado** en función del tipo de sonda^a.

| Tipo de sonda | Número mínimo de células analizadas | Punto de corte |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Sondas centroméricas | 100 núcleos ^b | Monosomía ≥ 30-40% |
| | | Trisomía ≥ 10% |
| Sondas de <i>locus</i> específico | 100 núcleos ^b | Deleción (con sonda control) ≥ 10-15% |
| | | Ganancia ≥ 10% |
| | | Reordenamiento ≥ 5% |

^a Los datos que se muestran en esta tabla son valores aproximados y se obtienen de la experiencia personal de los autores del presente documento. Es recomendable que cada centro calcule sus propios puntos de corte de positividad para cada tipo de sonda; ^b en muestras parafinadas, dada la dificultad de hacer un recuento de núcleos (infiltración en sábana), se puede realizar una estimación del porcentaje de núcleos con alteraciones mediante la visualización a 100× de múltiples campos dentro de la región tumoral marcada

Tabla 9. Criterios de análisis de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en función del tipo de muestra y la patología.

| Tipo de muestra | Contaje ^a | Punto de corte | Bibliografía |
|---|--|--------------------|---|
| Muestra en fresco sin cultivar LLC (SP/MO) | 100 núcleos | 5-10% ^b | Döhner <i>et al.</i> NEJM. 2000 |
| Muestra procedente de cultivo de citogenética | 100 núcleos | 1-5% | Zneimer. Curr Protoc Hum Genet. 2020 |
| Muestra procedente de separación celular (CD138+) | 50-100 núcleos | 10% | Ross <i>et al.</i> Haematologica. 2012 |
| Muestra procedente de separación celular por gradiente de densidad (granulocitos) | 100 núcleos | 1-5% | Reinhold <i>et al.</i> Leukemia. 2003 |
| Extensiones/Improntas | 100 núcleos | 1-5% | Buño <i>et al.</i> J Clin Pathol. 2005 |
| Tejido parafinado | 50-100 núcleos de un área tumoral marcada ^c | 5-40% ^c | Ventura <i>et al.</i> J Mol Diagn. 2006 |

^a Valores mínimos; ^b el punto de corte varía en función de la sonda. Para la detección de pérdida de TP53 el punto de corte es más elevado (10%) si no se utiliza sonda control; ^c punto de corte para pérdidas cromosómicas superior al de células en suspensión por efecto del corte (40%). Para reordenamientos el punto de corte es de un 5%

LLC: leucemia linfocítica crónica; MO: médula ósea; SP: sangre periférica

En la mayoría de los casos, un solo observador es competente para interpretar el resultado.

En los casos en el límite del punto de corte o discrepantes con la citogenética convencional, es recomendable la valoración por 2 observadores. Se considerará, en estos casos, la calidad general de la hibridación y las características clínicas del paciente.

En función de estos parámetros y a criterio facultativo, la muestra puede considerarse portadora o no de anomalía. Se recomienda que los laboratorios tengan a disposición un manual de capacitación de FISH en el que se describa cada sonda o conjunto de sondas utilizado. Para cada sonda deben incluirse imágenes fotográficas o dibujos de los patrones anormales (tanto patrones simples como las variantes más complejas) y los patrones normales, junto con comentarios útiles sobre el uso de la sonda en particular. La documentación que provee el fabricante de la sonda, las hojas de datos y las referencias pertinentes también deben incluirse en este manual.

3.2.5. Validación de la técnica

Cualquier sistema de FISH utilizado en el diagnóstico debe ser validado. El objetivo de la validación de la técnica es dar seguridad al ensayo, que sea lo más fiable, preciso y reproducible posible.

En primer lugar, es necesario evaluar si la hibridación es técnicamente aceptable para continuar con el análisis:

- Revisar la morfología nuclear (bordes del núcleo intactos).
- Ruido de fondo (el fondo debe aparecer negro/oscurito sin partículas fluorescentes).
- Intensidad de la señal (las señales de la sonda tienen que ser brillantes, compactas, redondas, distinguibles y fácilmente evaluables).

Una vez evaluada la hibridación a nivel técnico, debe analizarse la localización de la sonda (en metafases), su sensibilidad, la especificidad y el punto de corte o *cut-off* de la misma.

Para ello, deben usarse casos normales y anómalos conocidos. Para realizar los cálculos de sensibilidad, debemos tener en cuenta todos los patrones de hibridación posibles, no solo los esperados. Además, deben conservarse imágenes o dibujos de los patrones de señales normales y alteradas, tanto los más frecuentes como sus variantes.

Para aumentar la robustez de la técnica, se aconseja, además, realizar estudios paralelos entre el laboratorio y un laboratorio de referencia. Deben compararse los resultados e incluso las imágenes. Se aconseja un seguimiento bianual o continuo de la técnica⁽³⁸⁾. El observador decide bajo su criterio si se debe hacer validación para cada tipo de muestra o no, pero sí se debe validar por separado células en suspensión, extensión y en parafina⁽³⁹⁾.

Localización de la sonda de hibridación *in situ* fluorescente

Se trata de un procedimiento para establecer que la sonda de FISH utilizada hibrida en la región cromosómica esperada. Cuando se usa una sonda por primera vez, se recomienda confirmar la localización de las sondas de FISH sobre metafases, si el material lo permite⁽⁴⁰⁾. Es importante elegir metafases completas, con el mínimo solapamiento entre cromosomas. Se descartarán para este análisis las metafases que hayan perdido 1 o los 2 cromosomas interrogados. Se estudiarán un mínimo de 5 metafases de una muestra no alterada conocida.

El **criterio de aceptación** será: 100% de patrones de señales localizados en la región cromosómica esperada⁽⁴¹⁾.

Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad se define como el porcentaje de señales de la sonda que identifican la región cromosómica esperada en casos normales⁽⁴²⁾.

La especificidad se define como el porcentaje de señales de la sonda que identifican la región cromosómica esperada en casos patológicos⁽⁴²⁾.

Para realizar los cálculos de sensibilidad y especificidad, se recomienda utilizar muestras similares a las que presentan la alteración, por ejemplo, en el caso de la sonda *BCR/ABL1* se recomienda el estudio de FISH en MO de individuos *BCR-ABL1* negativos para establecer los valores de sensibilidad y especificidad. Es necesario analizar 200 núcleos de 20 muestras de individuos negativos para la alteración a testar y han de ser evaluados por 2 observadores (100 núcleos cada uno).

Los núcleos solapados, rotos o con señales de fluorescencia débiles deben ser descartados del análisis. Es preferible realizar el conteo usando un filtro doble, que permite visualizar 2 fluorocromos simultáneamente (por ejemplo, Spectrum Green/Spectrum Orange), alternando con el filtro DAPI, para identificar más fácilmente la localización de las señales en el núcleo. Se recomienda, además, estudiar 5 casos positivos de la alteración para determinar la precisión en la detección de la alteración.

Con respecto al **criterio de aceptación**, la sensibilidad y la especificidad deberían ser superiores al 95%. El porcentaje de núcleos con ruido de fondo/señales inespecíficas similares a las señales de la sonda ha de ser inferior al 5% (especificidad)⁽⁴¹⁾.

Para la evaluación del uso de sondas de FISH sobre poblaciones celulares separadas (por ejemplo, CP CD138 positivas), improntas o muestras fijadas sin cultivar (por ejemplo, linfocitos), se recomienda utilizar, del mismo modo, controles negativos procesados de la misma manera.

Para muestras en parafina, como no es posible obtener metafases, no se puede valorar directamente la especificidad y la sensibilidad; para ello, se obtienen los datos de los cálculos realizados sobre cultivos de linfocitos T.

Para las sondas comerciales, la casa comercial debería realizar los estudios de sensibilidad y especificidad de cada sonda. Pero se recomienda que cada laboratorio confirme la sensibilidad y la especificidad, sobre todo en muestras de parafina⁽⁴²⁾. Para sondas hechas a medida, *homemade*, se debe validar cada una de las sondas.

Los estudios de validación se realizarán con el método, manual o automatizado, que se utilice en el laboratorio. No se puede validar con los 2 métodos de análisis mezclados. Si el análisis es automatizado, los resultados deben compararse con el análisis manual (*gold standard*) y dejar reflejadas las diferencias obtenidas.

Cálculo de *cut-off* o punto de corte de células aisladas

El *cut-off* o punto de corte se define como el número de células con patrón de hibridación alterado a partir del cual el resultado se considera patológico. Actualmente, no existe consenso sobre cuál es el mejor método para determinar los valores de corte para las sondas FISH. Se utilizan diferentes modelos: estadística gaussiana, función inversa β , tratamiento binomial de los datos y métodos de cálculo de la desviación estándar^(38,43,44).

Si en el análisis de la muestra el porcentaje de núcleos con patología es cercano al límite del *cut-off*, se recomienda alargar el estudio o repetir la hibridación. Si los valores siguen siendo límites o no claros clínicamente, ayudaría realizar el análisis sobre metafases⁽²⁸⁾.

En los test que contienen múltiples sondas se validará cada sonda individualmente. En los test multisondas pero que se usan como un test simple (por ejemplo, UroVysion®, AneuVysion®), la validación será simple, todas las sondas se validan a la vez.

Cálculo de *cut-off* para cortes de tejidos incluidos en parafina

Debe realizarse sobre un mínimo de 5 secciones de tejido sano que usaremos como referencia y contar un mínimo de 100 núcleos. En el caso de los linfomas, suele usarse tejido de amígdalas de pacientes sanos. Debe hacerse un registro con el tipo de sonda, el tipo de tejido y el grosor del mismo (se recomienda mantener el mismo grosor para todas las muestras, de 3 a 4 μm)⁽⁴²⁾.

La principal limitación de realizar FISH sobre secciones de tejido es el artefacto generado por el corte que, sumado a la superposición de núcleos, aumenta la probabilidad de obtener pérdidas de señales de FISH⁽⁴⁵⁾. Por este motivo, el punto de corte para la detección de deleciones en tejido parafinado requiere una consideración especial y será mayor que el utilizado para células en suspensión (Tabla 9). Además, debemos tener en cuenta que el punto de corte se ve influenciado por la condensación del ADN de las células del tumor, el tamaño del núcleo y la ploidía, factores que no quedan incluidos en el estudio de tejido sano a la hora de establecer el punto de corte.

Idealmente, para el estudio de reordenamientos en secciones de tejido parafinado se utilizan sondas BA, para las que el punto de corte se establece en un 1-5%, considerándose un patrón positivo cuando la distancia entre las señales flanqueantes es de 2-3 veces el diámetro de la señal⁽³⁷⁾. En el caso de usar sondas DF, el punto de corte en tejido normal se establece para cada sonda. La pérdida de uno de los cromosomas derivados implicados en el reordenamiento (una única señal de fusión) es un fenómeno recurrente en linfomas, observándose también en tejido normal por efecto del corte. En estas situaciones se establece un punto de corte del 15% (Tabla 8).

En el estudio del *cut-off* en tejido parafinado debe tenerse en cuenta la complejidad de las reorganizaciones y la posibilidad de que aparezcan patrones variantes que difieren de los definidos para cada sonda. Estos patrones variantes deben reportarse e interpretarse juntamente con los datos del informe de anatomía patológica y lo descrito en la literatura⁽³⁷⁾.

Para el análisis de FISH en secciones de tejido parafinado, es necesario que el patólogo responsable marque la zona tumoral en una laminilla teñida con H&E secuencial al corte de FISH. En regiones con morfología mixta deberá realizarse FISH en todas las regiones marcadas y analizar los patrones de hibridación en ambas áreas. Para estudios de parafina que son complicados, puede ser útil el análisis automatizado para mejorar la precisión del conteo⁽⁴⁵⁾.

3.3. Técnica de *microarrays* genómicos

3.3.1. Conceptos básicos

El desarrollo tecnológico e informático ha permitido la creación de plataformas que permiten el análisis de todo el genoma a una resolución alta. Estas plataformas son los *microarrays*. Con la misma base que la CGH, pero en lugar de hibridar en portaobjetos con metafases, los *microarrays* genómicos hibridan en matrices sólidas que contienen BAC, oligonucleótidos o SNP que pueden cubrir todo el genoma, lo que permite detectar cambios genéticos de hasta 15 kb. Además, el análisis de *microarrays* es un proceso automatizado y los resultados obtenidos pueden ser más objetivos y sistemáticos que los análisis al microscopio.

El análisis mediante *microarrays* tiene una alta resolución para anomalías desequilibradas (ganancias y pérdidas), llamadas alteraciones del número de copias (CNA), que pueden escapar a la detección por cariotipo e incluso FISH. Algunas de estas pequeñas CNA se han asociado a importantes implicaciones pronósticas en tipos específicos de hemopatías –como, por ejemplo, las deleciones de IKZF1 en la leucemia linfoblástica aguda (LAL)⁽⁴⁶⁾– y, por tanto, identificarlas es muy recomendable en el diagnóstico de estas patologías. Otra aplicación potencial de los *microarrays* es la sustitución de paneles de múltiples sondas de FISH para el análisis del número de copias. Por ejemplo, en la LLC o el MM, los *microarrays* pueden proporcionar una amplia visión de todo el genoma en un solo experimento, en lugar de realizar más de 4 determinaciones de FISH para obtener una información más restringida sobre las alteraciones de los casos^(47,48).

Una ventaja adicional de las plataformas que incluyen sondas SNP es su capacidad para detectar la pérdida de heterocigosidad sin alteración de número de copia (*copy number neutral loss of heterozygosity* –CN-LOH–), un tipo de alteración que no se detecta mediante bandas G ni FISH. Las CN-LOH adquiridas pueden ser indicativas de mutaciones puntuales en genes supresores de tumores que pasan a ser bialélicas debido a la presencia de la CN-LOH y, por lo tanto, orientan a realizar estudios mutacionales de esa región o gen concreto. Además, la determinación de la diferenciación alélica en los *arrays* de SNP también permite detectar el tipo de ploidía, una información de gran importancia pronóstica en algunas hemopatías como LAL y MM.

No obstante, los *microarrays* tienen algunas limitaciones principales respecto a las técnicas convencionales, como la incapacidad para detectar alteraciones cromosómicas equilibradas o distinguir entre clones individuales. Por otro lado, los *microarrays* presentan una sensibilidad limitada (20-25%), por lo que no serían una técnica de elección para el seguimiento de enfermedad mínima residual o el estudio de muestras con baja representación tumoral.

Los *microarrays* se pueden aplicar en el estudio de casi todas las neoplasias hematológicas, aunque pueden ser más relevantes en aquellas en las que las principales alteraciones son ganancias o pérdidas, como LAL^(46,49), SMD⁽⁵⁰⁾, LLC^(47,51) y MM⁽⁴⁸⁾. El estudio por *microarrays* no solo permite la identificación de CNA con relevancia diagnóstica y/o pronóstica en la práctica clínica, los resultados obtenidos hasta el momento han permitido conocer nuevas alteraciones genéticas, así como determinar nuevos genes relacionados con las hemopatías. Esta información probablemente mejorará el conocimiento de los mecanismos genéticos involucrados en el desarrollo neoplásico y, además, permitirá el establecimiento de nuevas variables diagnósticas, predictivas y pronósticas en neoplasias hematológicas.

3.3.2. Procedimiento técnico

El procedimiento técnico de los *microarrays* dependerá de las especificaciones de cada plataforma y se deberán seguir estrictamente las instrucciones y recomendaciones del fabricante. A modo de resumen, se dispone de 2 metodologías distintas en función del tipo de *microarray* que se vaya a utilizar: CGH o SNP.

Técnica para *microarrays* de hibridación genómica comparada

Los *microarrays* de CGH siguen la misma base que la técnica de CGH convencional, aunque en este caso la hibridación se realiza sobre un soporte sólido con millones de sondas de ADN que cubren todo el genoma. Al igual que en la técnica de CGH, el ADN de la muestra y el ADN de referencia o control se digieren y se marcan con diferentes fluoróforos (generalmente rojo para el ADN de la muestra y verde para el ADN control). Seguidamente, se hibridan conjuntamente (hibridación competitiva) sobre un mismo *microarray*.

Mediante un *software* se capturan y cuantifican las intensidades relativas de fluorescencia de los ADN marcados con cada fluoróforo. La ratio de fluorescencia entre las señales del ADN de la muestra y del ADN de referencia proporciona información sobre el número de copias del genoma de la muestra. De esta manera, una mayor intensidad de fluorescencia de la muestra a estudiar es indicativa de ganancia de material en esa región.

Por el contrario, una mayor intensidad de la muestra de referencia indica la pérdida de material en la muestra que se está analizando. Un color neutro, generalmente amarillo (por la mezcla de los fluoróforos rojo y verde), indica que no hay diferencias en el número de copias de las 2 muestras (control y problema).

Técnica para *microarrays* de polimorfismos de un solo nucleótido

En este caso, se trata de una hibridación del ADN de la muestra directamente sobre las sondas del *microarray*, por lo que no se requiere muestra normal o referencia. En una primera etapa se realiza una PCR del ADN genómico. En este proceso, el ADN se digiere mediante enzimas de restricción, seguidamente unos adaptadores específicos que reconocen los fragmentos generados se ligan al ADN y, por último, se amplifican estos fragmentos.

A continuación, el producto de la PCR se purifica y se fragmenta, lo que permite obtener pequeños fragmentos de ADN similares al tamaño de las sondas del *microarray* (> 25 pb). Estos fragmentos de ADN se marcan homogeneamente y se hibridan sobre el *microarray*. Finalmente, tras los lavados, se procede al escaneado y análisis de las imágenes obtenidas (Figura 7).

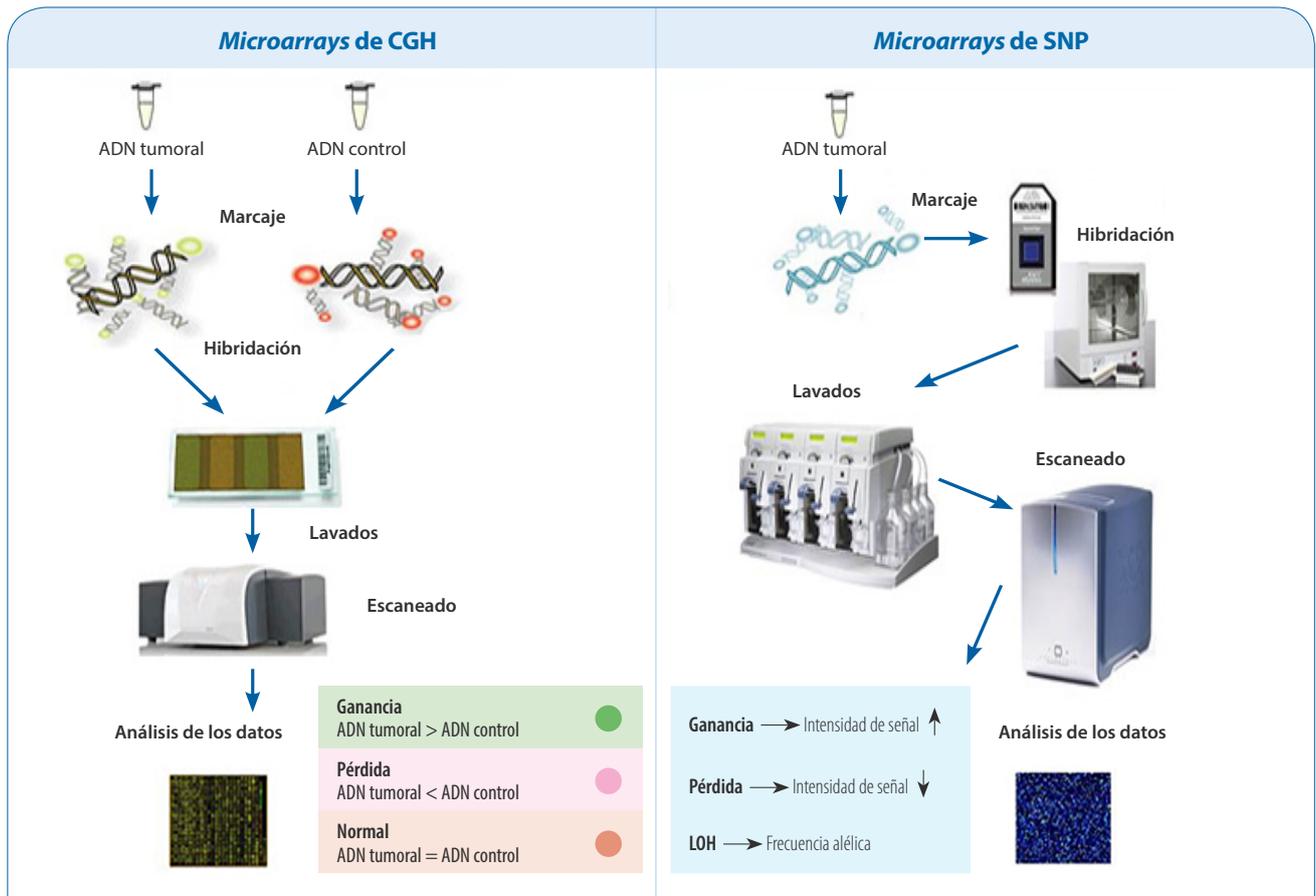


Figura 7. Esquema comparativo de las técnicas de *microarrays*. CGH: hibridación genómica comparada; LOH: pérdida de heterocigosidad; SNP: polimorfismos de un solo nucleótido.

3.3.3. Análisis de datos e interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados de *microarrays* y la edición de informes clínicos en hematología pueden resultar complejas, especialmente en aquellos casos que presentan una elevada complejidad genómica; por lo tanto, es necesario seguir unas directrices de consenso para la estandarización del análisis mediante *microarrays*. En este sentido, algunos grupos han propuesto guías para el análisis de *microarrays* genómicos en muestras neoplásicas⁽⁵²⁾ o, más específicamente, en neoplasias hematológicas⁽⁵³⁾. A pesar del alto grado de estandarización en los algoritmos de análisis para la detección de CNA ofrecidos por las distintas casas comerciales, su interpretación todavía puede suponer un reto y debe ser adaptada a los nuevos descubrimientos realizados en cada enfermedad y, lo que es más importante, a la necesidad clínica específica de cada alteración.

A continuación, se presentan algunas consideraciones relevantes a tener en cuenta en la interpretación de los resultados de *microarrays*.

Elección de la plataforma de *microarrays* y criterios de análisis (*software*)

Para implementar el estudio por *microarrays* en el laboratorio de rutina es imprescindible verificar que las alteraciones con impacto diagnóstico y/o pronóstico que pretendemos estudiar en cada neoplasia hematológica son susceptibles de ser identificadas con la plataforma de *microarrays* seleccionada. Los aspectos a revisar para la elección de la plataforma de *microarray* de trabajo entre la multitud de *microarrays* disponibles en el mercado, o diseños a medida ofrecidos por algunas casas comerciales, son los siguientes:

- **Diseño del *microarray*:** es importante comprobar que las regiones de interés para las patologías en las que se aplicará el estudio de *microarrays* presentan una correcta cobertura de sondas en su diseño.
- **Resolución del *microarray*:** está determinada por la distancia entre las sondas que forman el *microarray* y va a limitar el tamaño mínimo de las CNA a detectar. Este aspecto es especialmente importante en el estudio de patologías en las que se pretende identificar determinadas CNA de tamaño pequeño, como en la LAL.

- **Inclusión de sondas de SNP:** la definición de la ploidía de la muestra o la detección de regiones con CN-LOH únicamente se puede realizar con *microarrays* de SNP. Por otra parte, la información de la diferencia alélica que ofrecen estas sondas puede ser de utilidad para la interpretación de alteraciones en casos complejos, con CNA presentes en baja frecuencia o con una hibridación del *microarray* subóptima.

En cuanto al análisis de alteraciones, los criterios para considerar una región alterada (en función del valor de log2 ratio, número de sondas alteradas o tamaño, entre otras) pueden diferir según el *software* y la plataforma de *microarrays* utilizada, por lo que es aconsejable seguir las indicaciones que recomiende la casa comercial que se esté utilizando. No obstante, se recomienda aplicar distintos filtros de análisis de resultados adaptados a la región del genoma estudiada:

- Filtros en citorreiones: se aplican en aquellas regiones del genoma o genes específicos asociados a la hemopatía que se está estudiando y deberán permitir la detección de CNA focales de pequeño tamaño. Es muy importante actualizar las citorreiones de forma regular según avance el conocimiento en cada hemopatía.
- Filtros *genome-wide*: es un filtrado general de todo el genoma, que puede ser más permisivo en cuanto al tamaño de las alteraciones.

El análisis específico de las citorreiones puede realizarse manualmente o aplicando unos criterios de filtrado automático de alteraciones diferente en estas regiones, en el caso de que el *software* permita generar ficheros de citorreiones con parámetros de análisis variables (por ejemplo, con Chromosome Analysis Suite®, Thermo Fisher). En cualquier caso, se recomienda realizar siempre una inspección visual global de los valores de log2 ratio y de la pista de diferencias alélicas (en *arrays* de SNP) para acabar de definir las alteraciones.

Interpretación y clasificación de los resultados

Cada CNA detectada en un análisis de *microarrays* debe clasificarse según su relevancia clínica, en función del conocimiento de la patología estudiada y de las guías publicadas o bases de datos públicas disponibles (se describen ejemplos al final del capítulo). Se recomienda distinguir entre las siguientes categorías:

1. Variante benigna o probablemente benigna: son variantes poblacionales que no se asocian con la patología estudiada (por ejemplo, no afectan ningún gen o ningún gen relevante en cáncer, respectivamente) o CNA que se asocian a procesos fisiológicos normales de la célula estudiada. Estas variantes no deben ser incluidas en el informe de resultados. En esta categoría se incluyen:

- CNA polimórficas o constitucionales: las alteraciones constitucionales pueden ser identificadas realizando un estudio de *microarrays* apareado con muestra no tumoral del propio paciente. No obstante, esta no es una práctica habitual en muchos laboratorios de rutina debido al coste asociado a este estudio y la dificultad para obtener ADN normal en algunos casos. Como alternativa, se pueden clasificar como polimórficas aquellas CNA que solapen con variantes descritas en la base de datos DGV (Database of Genomic Variants) o en bases de datos propias generadas a partir del estudio de controles locales.
- CNA focales en los genes del receptor de células T o de inmunoglobulinas (**Tabla 10**): se consideran benignas ya que no se asocian a la enfermedad, sino que se generan durante el proceso de reordenamiento que tiene lugar de forma fisiológica en el desarrollo de los linfocitos T o B.

Tabla 10. Coordenadas génicas de los genes del receptor de células T (*TRA*, *TRB*, *TRG*, *TRD*) o de inmunoglobulinas (*IGH*, *IGK*, *IGL*).

| Gen | Citobanda | Coordenadas (GRCh37/hg19) |
|------------|-----------|-------------------------------|
| <i>IGK</i> | 2p11.2 | chr2:89,890,568-90,274,235 |
| <i>IGH</i> | 14q32.33 | chr14:106,032,614-107,288,051 |
| <i>IGL</i> | 22q11.22 | chr22:22,380,474-23,265,085 |
| <i>TRA</i> | 14q11.2 | chr14:22,090,057-23,021,075 |
| <i>TRD</i> | 14q11.2 | chr14:22,891,537-22,935,569 |
| <i>TRG</i> | 7p14.1 | chr7:38,279,625-38,407,656 |
| <i>TRB</i> | 7q34 | chr7:141,998,851-142,510,972 |

2. Variantes patogénicas asociadas a la patología de estudio: son variantes ampliamente descritas en la literatura que tienen implicaciones importantes en el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad. Estas variantes deben ser incluidas en el informe de resultados, independientemente de su tamaño.

3. Variantes adquiridas no específicas de la patología de estudio: son variantes cuya implicación en el desarrollo de la hemopatía se desconoce. La interpretación de estas CNA dependerá del consenso establecido en el propio laboratorio y de la patología de estudio. Para reducir la posibilidad de incluir alteraciones benignas, se recomienda aplicar un filtro de tamaño de 5 Mb.

Todas aquellas variantes con un tamaño ≥ 5 Mb deben ser incluidas en el informe final. Las CNA < 5 Mb deberán ser consideradas individualmente para establecer su relevancia según los criterios del propio laboratorio. A medida que el laboratorio tenga más experiencia en el análisis de *microarrays*, se podrán utilizar filtros de tamaño menos restrictivos. En el caso de que alguna de las variantes no específica de la patología haya sido descrita previamente en la literatura y se considere clínicamente relevante, deberá referenciarse dicha publicación (Figura 8).

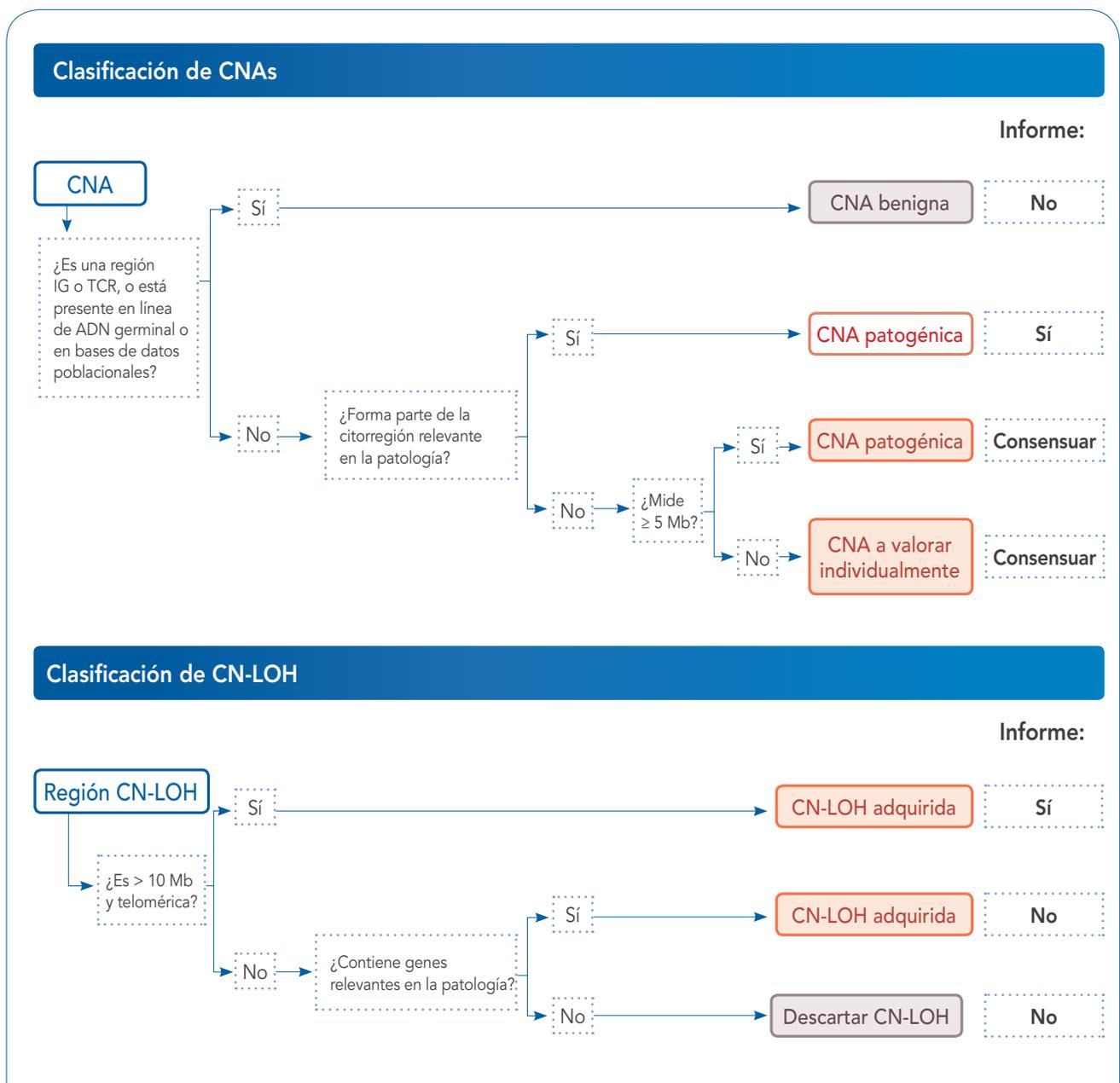


Figura 8. Esquema del algoritmo para la interpretación y la clasificación de las alteraciones del número de copias (CNA) y pérdida de heterocigosidad sin alteración de número de copia (*copy number neutral loss of heterozygosity*–CN-LOH–) detectadas por *microarrays*.

La interpretación de las regiones con CN-LOH dependerá de los genes incluidos, del tamaño, de su localización y de la consanguinidad del paciente. Para considerar una región con CN-LOH como adquirida es necesario que tenga un tamaño > 10 Mb y que se extienda hacia los telómeros. Si realizando un estudio paralelo con muestra no tumoral del mismo paciente se encuentran regiones CN-LOH claramente adquiridas de un tamaño inferior, deberán informarse.

Estas regiones pueden enmascarar mutaciones puntuales en genes supresores de tumores. Por este motivo, si las CN-LOH afectan a una región que contiene un gen asociado al desarrollo de la enfermedad, es importante sugerir un estudio adicional mediante secuenciación. Si las CN-LOH encontradas no incluyen ningún gen relevante en cáncer, se informarán sin sugerir estudios moleculares adicionales (**Figura 8**).

A continuación, se detallan algunas de las bases de datos públicas que pueden ser consultadas para realizar la clasificación de las CNA o CN-LOH identificadas en el análisis de *microarrays*:

- International Cancer Genome Consortium (ICGC): <https://icgc.org/>.
- The Cancer Genome Atlas (TCGA): <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga> ; <http://software.broadinstitute.org/software/igv/tcga>.
- cBioPortal for Cancer Genomics: <https://www.cbioportal.org/>.
- *Cancer genome data* – progenetix: <https://progenetix.org/>.
- COSMIC: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
- Cancer Genomics Consortium: http://www.cancergenomics.org/databases_and_gene_lists.php.

4. Fase postanalítica

4.1. Redacción de informes

Los informes de resultados derivados de pruebas de laboratorio deben cumplir con la normativa legal vigente en España⁽⁵⁴⁾, cualquiera que sea el soporte de estos, electrónico o en papel, y serán de aplicación en todos los centros y dispositivos asistenciales que integran el Sistema Nacional de Salud (centros públicos o privados).

El conjunto mínimo de datos que debe aparecer en los informes de resultados de pruebas de laboratorio, entre las que se encuentran las pruebas de citogenética y biología molecular, se detalla en el anexo V del citado Real Decreto. Hay que destacar que las comunidades autónomas podrán establecer sus respectivos modelos de documentos clínicos incorporando otras variables que consideren apropiadas, siempre que integren el conjunto mínimo de datos propuesto.

Por tanto, será obligatoria la presencia de los siguientes datos:

1. Datos del documento:

- Tipo de documento (informe de resultados de "especificar tipo de prueba").
- Fecha de firma (dd/mm/aaaa). Común a pie de firma del informe.
- Nombre y apellidos del responsable 1 junto a la categoría profesional. Parte del primer pie de firma del informe.
- Nombre y apellidos del responsable 2 junto a la categoría profesional. Parte del segundo pie de firma del informe, que suele supervisar al primer firmante.
- Servicio y/o unidad.

2. Datos de la institución emisora:

- Denominación del servicio de salud (nombre y logo).
- Denominación del centro (nombre y logo).
- Dirección completa del centro (tipo de vía, nombre de la vía, número de la vía, código postal, municipio, provincia, país, teléfono).

3. Datos del paciente:

- Nombre y apellidos.
- Fecha nacimiento (dd/mm/aaaa).
- Sexo (H/M).
- Número de historia clínica.

4. Datos del solicitante:

- Denominación del servicio de salud (nombre).
- Denominación del centro (nombre). Servicio. Unidad.
- Nombre y apellidos del solicitante.

5. Datos del proceso asistencial:

- Datos de la muestra:
 - Fecha de toma de la muestra (dd/mm/aaaa).
 - Tipo de muestra.
- Determinación.
- Técnica.
- Resultado/Descripción.
- Conclusión.

Por otro lado, siguiendo las recomendaciones europeas para asegurar la calidad en los análisis citogenómicos (cariotipo, FISH y *microarrays*) de las neoplasias hematológicas⁽²⁸⁾, los informes de resultados deberían cumplir con los estándares de la normativa ISO 15189⁽⁵⁵⁾.

Los informes de resultados deben ser precisos y claros, evitando las ambigüedades. Cada laboratorio debe elegir el formato (electrónico o en papel) en el que se comunicarán los resultados, así como tener un procedimiento que garantice la correcta transcripción de los resultados. Los informes deben incluir toda la información necesaria para la interpretación de los resultados. Los laboratorios deberían informar a los centros peticionarios de la demora en la obtención de resultados, si este hecho puede comprometer el cuidado del paciente.

Siguiendo las recomendaciones europeas⁽²⁸⁾, en referencia a los informes es importante:

- Indicar el motivo de solicitud de la prueba. Indicación clínica.
- Señalar los nombres de los genes significativos situados en los *loci* implicados en cualquier alteración recurrente observada.
- Para denominar una fusión o un reordenamiento, según las recomendaciones europeas, los genes involucrados deberían escribirse separados por un guion (por ejemplo, *BCR-ABL1*), reservando el símbolo / para las mezclas de sondas⁽²⁸⁾. En una publicación reciente del HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)⁽⁵⁶⁾ se recomienda utilizar la barra en caso de reordenamientos, reservando el guion para los *readthrough transcripts*. Actualmente, no existen guías oficiales de nomenclatura de reordenamientos, así que las 2 formas son aceptables.
- Evitar los informes demasiado largos que resten claridad a los resultados.
- Colocar números de página en los informes (por ejemplo, 1 de 2, 2 de 2).
- Mencionar las limitaciones de los análisis o la incertidumbre de los resultados, especialmente en aquellos casos que no hayan alcanzado el estándar recomendado en guías de consenso.
- Es aconsejable indicar en el informe las consecuencias clínicas de las alteraciones genéticas encontradas; de lo contrario, si se trata de un documento puramente técnico, debería señalarse que la interpretación de los resultados se realizará por el clínico solicitante. No obstante, la decisión de añadir información clínica (pronóstico y tratamiento) quedará en manos del propio servicio, de acuerdo con los servicios clínicos solicitantes. En el caso de incluir información clínica, debe adjuntarse bibliografía.

En los **Anexos 2-5** (página 48) se muestran ejemplos de modelos de informes de las distintas técnicas.

4.1.1. Descripción analítica

Cariotipo

- Para la formulación usar la última versión del International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) para describir los resultados de los análisis de bandeo cromosómico.
- Se recomienda añadir una descripción de la fórmula ISCN que incluya: número de copias perdidas o ganadas de un cromosoma y/o descripción de reordenamientos o alteraciones estructurales clínicamente relevantes, incluyendo los genes implicados.
- Las alteraciones encontradas en una única célula se reportarán únicamente si se han detectado en un estudio previo. Si es una alteración descrita de manera recurrente y asociada a hemopatía maligna, intentar validar la clonalidad con otras técnicas; si el resultado es negativo, se debe citar la anomalía en la descripción del resultado pero no en la fórmula ISCN⁽²⁷⁾.
- Los heteromorfismos no deberían incluirse en las fórmulas ISCN. Pueden mencionarse en la descripción de los resultados⁽²⁸⁾. Sería opcional poner una nota a pie de página que indique que “no se describirán los heteromorfismos o variantes de la normalidad” si se decide no incluirlos en la descripción. No obstante, en algunos casos pueden ser útiles para distinguir entre dos o más líneas celulares o clones distintos, por ejemplo en estudios de quimerismo postasplante.

Hibridación *in situ* fluorescente

- Para la formulación, usar la última versión del ISCN para describir los resultados de FISH.
- El informe de FISH debe incluir el fabricante de la sonda, las limitaciones de la prueba, si el análisis de la muestra se realiza en células en interfase y/o metafase, el número de células normales y anormales, y si el material estudiado procede de células cultivadas o no.
- En los resultados de FISH, puede describirse el número de células estudiadas y el número de células alteradas o directamente el porcentaje. En las muestras de parafina en las que no es posible realizar un recuento es un campo opcional.
- Se recomienda describir los resultados de FISH como patrón de hibridación normal o anormal/alterado. No se deben utilizar los términos positivo o negativo.
- Cuando se comente un resultado complejo de forma resumida, debería indicarse si existen o no alteraciones con significado clínico. Los resultados completos detallados deben aparecer en el informe.

Microarrays

El contenido específico de los informes de los *microarrays* debe incluir:

- Las especificaciones técnicas del *microarray* (tipo de *microarray*, densidad de las sondas y resolución funcional media alcanzada) y el *software* de análisis (nombre del programa y versión) utilizados. El método de análisis (número mínimo de sondas consecutivas alteradas, tamaño mínimo considerado para las CNA, longitud y tipo de las regiones de CN-LOH, etc.). Información sobre los controles de calidad.
- Los criterios aplicados para la inclusión o exclusión en el informe de los distintos tipos de CNA.
- La fórmula descriptiva de las CNA reportadas según la normativa ISCN vigente, que incluirá las posiciones nucleotídicas de inicio y final de la alteración y la versión del genoma (en caso de no estar especificada en la descripción de la técnica y método de análisis). En casos excepcionales se puede editar un informe descriptivo de las alteraciones sin la fórmula ISCN (por ejemplo, en aquellos en los que exista una gran complejidad genómica).
- Una descripción de los resultados que debe consistir en un listado o tabla de las CNA descritas en la fórmula ISCN e incluir: localización cromosómica y tamaño de la alteración, tipo de alteración (pérdida, ganancia, CN-LOH), genes de importancia clínica afectados y la ploidía y/o complejidad del genoma cuando proceda.
- Una interpretación de los resultados para correlacionarlos con el diagnóstico y/o el pronóstico, cuando proceda y con previo acuerdo con el clínico solicitante. En este caso, es recomendable incluir un aviso sobre la importancia de interpretar los resultados de manera integrada con el resto de las pruebas diagnósticas de laboratorio y en el contexto clínico del paciente (asociar bibliografía).

- En los casos en que se crea necesario, se deben recomendar técnicas adicionales para confirmar resultados. Por ejemplo, en un caso con una CN-LOH que afecte un gen diana se deberá recomendar un estudio mutacional del gen.
- Información sobre las limitaciones de la técnica, como son la no detección de reordenamientos equilibrados, alteraciones clonales con baja infiltración, presencia de distintos clones, etc.

Los criterios de inclusión o exclusión de los distintos tipos de CNA en el informe de *microarrays* son:

- Las CNA patogénicas se incluirán siempre en el informe. En estos casos, se puede hacer constar la correlación con la orientación diagnóstica si es inequívoca y la importancia en el pronóstico si está bien establecida.
- No es necesario incluir las CNA benignas o polimorfismos en los informes.
- Las CNA adquiridas no específicas de patología pueden ser incluidas opcionalmente en el informe. La decisión dependerá, en gran medida, del tipo de hemopatía en estudio y del consenso acordado con los clínicos. Por ejemplo, debido a la gran cantidad de alteraciones no específicas que se pueden encontrar en un solo caso de LAL, es aconsejable no incluirlas en el informe y reportar solamente las CNA patogénicas. En este caso, debe indicarse en el informe que todas las demás CNA encontradas han sido analizadas y pueden solicitarse al laboratorio si se desean.

En cambio, en casos de SMD o de LLC en los que clásicamente se encuentran menos alteraciones y además la complejidad genómica tiene importancia pronóstica^(51,57,58), es recomendable informar todas las CNA adquiridas detectadas consideradas relevantes y especificar en el informe si se ha aplicado algún filtro de tamaño en su clasificación. En cualquier caso, si se decide incluir estas CNA en el informe, deben distinguirse claramente de las patogénicas y añadir un comentario en caso de que sean relevantes clínicamente.

- Se pueden identificar CNA que causan otras enfermedades no relacionadas con el motivo de estudio (enfermedades congénitas de presentación tardía y que pueden ser heredables o estados de portador sano). Por ello, es importante disponer de un consentimiento informado donde se indique la voluntad del paciente de conocer o no estos hallazgos incidentales. En los casos en que se reporten, será imprescindible recomendar una valoración de especialistas en asesoramiento genético.
- Por último, es conveniente distinguir entre un análisis de *microarray* como método de diagnóstico o bien en un ámbito de investigación. En caso de fines científicos o experimentales, la elección de las CNA a informar e incluso los criterios de análisis (filtrado) pueden variar según el propósito de los investigadores.

4.1.2. Interpretación de los resultados

- Se debe tener en cuenta que la interpretación completa de los resultados requiere del contexto clínico y relacionar las anomalías encontradas con la causa de consulta (diagnóstico diferencial, alteraciones asociadas con otras causas). Existen alteraciones que pueden ser constitucionales o relacionadas con la edad avanzada del paciente –trisomía 8, del(20q) en mosaico, pérdida del cromosoma Y, pérdida del cromosoma X o +15–; debe aclararse que estos cambios pueden encontrarse en pacientes ancianos sin neoplasia hematológica.
- Recomendar cualquier otra prueba necesaria para clarificar los resultados obtenidos (por ejemplo, FISH).
- Usar la nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud (OMS) vigente⁽⁵⁹⁾ en relación con la clasificación de las patologías.
- En las ocasiones en las que no se dispone de información clínica y no se puede contactar con el clínico, debe indicarse que el resultado no se puede correlacionar con el motivo de consulta.
- Las referencias al pronóstico deben basarse en la evidencia de ensayos clínicos de pacientes tratados con esquemas terapéuticos similares o en metaanálisis de diferentes estudios que deben ser referenciados.
- Se recomienda no utilizar el término genérico “maligno” en el contexto de un clon de significado incierto. En su lugar, podría utilizarse “clon cromosómicamente aberrante”.
- Si se requiere un genoma de referencia (análisis con *microarrays*), este debe aparecer en el informe, por ejemplo, en la fórmula ISCN.

4.2. Tiempos de emisión de informes

Los tiempos máximos recomendados de emisión de informes citogenéticos, en días naturales, se detallan en la **Tabla 11**. Siguiendo la normativa ISO 15189 y las recomendaciones europeas⁽²⁸⁾, se espera que un 90-95% de los casos sean reportados en los plazos de tiempo establecidos en este documento.

Tabla 11. Tiempos de emisión de informes.

| | Cariotipo | FISH | Fragilidad cromosómica | Microarray |
|--------------------------|------------|------------|------------------------|------------|
| Urgente ^a | 24-72 h | 4-24 h | 5-7 días ^b | – |
| Prioritario ^c | 5-7 días | 5-7 días | – | – |
| Rutina ^d | 15-21 días | 15-21 días | 21-30 días | 30 días |

^a Se considera un informe urgente cuando el resultado es necesario para tomar una decisión terapéutica o una urgencia para una confirmación en el diagnóstico cuya demora implique riesgo vital. Entre estos se hallan las sospechas diagnósticas de leucemia aguda promielocítica con t(15;17), *PML-RARA*, descartar la t(9;22), *BCR-ABL* en la leucemia aguda linfoblástica, así como la sospecha diagnóstica de linfoma de Burkitt que precisen de confirmación del reordenamiento de *MYC* por citogenética y/o hibridación in situ fluorescente (FISH)

^b En aquellos pacientes que estén pendientes de trasplante de médula ósea

^c Son prioritarios aquellos informes en los cuales los datos citogenéticos son necesarios para el diagnóstico y la estratificación pronóstica. Dentro de los casos prioritarios se encuentran las leucemias agudas mieloides, leucemias agudas linfoblásticas, los síndromes mielodisplásicos de alto grado y la leucemia mieloide crónica

^d El resto de los casos de diagnóstico y de seguimiento de enfermedad se consideran estudios rutinarios.

En referencia a aquellos casos candidatos a ser incluidos en protocolos de tratamiento específico o ensayos clínicos, se recomienda revisar la normativa específica de cada protocolo

4.3. Almacenaje, custodia y preservación de datos y documentos (peticiones, informes, imágenes, datos de *microarrays* genómicos)

La normativa a nivel estatal para el almacenamiento de documentos viene regulada por la Ley básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica⁽¹⁾. En ella se establece que los centros sanitarios tienen la obligación de conservar la documentación clínica en condiciones que garanticen su correcto mantenimiento y seguridad, aunque no necesariamente en el soporte original, para la debida asistencia al paciente durante el tiempo adecuado a cada caso y, como mínimo, 5 años contados desde la fecha del alta de cada proceso asistencial.

No obstante, el artículo 17 de la Ley 41/2002 ha sufrido una modificación importante a través de la Ley 19/2015⁽⁶⁰⁾ de medidas de reforma administrativa en el ámbito de la Administración de Justicia y del Registro Civil y, concretamente, mediante su Disposición Final Cuarta. Dicha Disposición Final Cuarta, apartado 2, establece literalmente que:

Se modifican los apartados 1 y 2 del artículo 17, que quedan redactados del siguiente modo:

1. Los centros sanitarios tienen la obligación de conservar la documentación clínica en condiciones que garanticen su correcto mantenimiento y seguridad, aunque no necesariamente en el soporte original, para la debida asistencia al paciente durante el tiempo adecuado a cada caso y, como mínimo, **cinco años** contados desde la fecha del alta de cada proceso asistencial.

2. La documentación clínica también se conservará a efectos judiciales de conformidad con la legislación vigente. Se conservará, asimismo, cuando existan razones epidemiológicas, de investigación o de organización y funcionamiento del Sistema Nacional de Salud. Su tratamiento se hará de forma que se evite en lo posible la identificación de las personas afectadas.

Es importante destacar que son de aplicación a la documentación clínica las medidas técnicas de seguridad establecidas por la legislación reguladora de la conservación de los ficheros que contienen datos de carácter personal y, en general, por la Ley orgánica 3/2018 de protección de datos personales y garantía de los derechos digitales (véase el apartado 4.6. Confidencialidad).

Por lo que se refiere a la conservación de datos genéticos, la Ley de investigación biomédica⁽²⁾ (título V, capítulo II, artículo 52) indica asimismo que los datos genéticos de carácter personal se conservarán durante un periodo mínimo de **5 años** desde la fecha en que fueron obtenidos, transcurrido el cual el interesado podrá solicitar su cancelación.

Si no mediase solicitud del interesado, los datos se conservarán durante el plazo que sea necesario para preservar la salud de la persona de quien proceden o de terceros relacionados con ella. Fuera de estos supuestos, los datos únicamente podrán conservarse, con fines de investigación, de forma anonimizada, sin que sea posible la identificación del sujeto fuente.

Se ha de tener en cuenta que junto con la regulación de ámbito estatal existen regulaciones específicas por cada comunidad autónoma.

4.4. Almacenaje de muestras (*pellets*, extensiones, ADN)

La Ley de investigación biomédica⁽²⁾ (título V, capítulo III, artículo 61) se refiere a la conservación y destrucción de muestras. Según la ley, en el caso de que la muestra sea conservada, el sujeto fuente será informado por escrito de las condiciones de conservación, objetivos, usos futuros, cesión a terceros y condiciones para poder retirarlas o pedir su destrucción.

No obstante, las muestras biológicas utilizadas en investigación biomédica se conservarán únicamente en tanto sean necesarias para los fines que justificaron su recogida, salvo que el sujeto fuente haya otorgado su consentimiento explícito para otros usos posteriores. Lo indicado en el apartado anterior se entiende aplicable en tanto los datos de identificación de la muestra no hayan sido sometidos a su anonimización de conformidad con lo previsto en esta ley.

En conclusión, las muestras biológicas que no hayan sido recabadas con fines de investigación deben conservarse durante 5 años, si bien tal y como se ha indicado anteriormente se deberá tener en cuenta la normativa específica que cada comunidad autónoma haya desarrollado con el fin de regularizar la conservación de dichas muestras biológicas.

4.5. Gestión de la Calidad

4.5.1. Programas de evaluación externa de calidad

Objetivos y funcionamiento

Es recomendable que los laboratorios que desarrollan actividades de diagnóstico citogenético participen en programas globales de evaluación externa de calidad (EEC). Este programa puede ser nacional (Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia, <https://www.sehh.es/>) o europeo (Genomics Quality Assessment –GenQA–, <https://www.genqa.org/>).

Estos programas son una aproximación sistemática para comprobar de forma objetiva el rendimiento del laboratorio. Los programas de evaluación deben ser reconocidos/respaldados por la profesión citogenética o una sociedad genética nacional. El objetivo principal de la EEC es garantizar que los laboratorios ofrezcan un servicio de la mejor calidad posible. Para poder medir el rendimiento de un laboratorio individual se siguen estándares nacionales/internacionales.

Estos programas tienen 3 propósitos:

1. Proporcionar una herramienta de control interno que asegure que la información que genera y proporciona un laboratorio es precisa, apropiada y clínicamente útil, y que se reporta en un tiempo adecuado.

2. Proporcionar a las agencias reguladoras información fiable sobre si los laboratorios están generando datos apropiados.
3. Asegurar que las muestras sean analizadas en un sistema que proporciona resultados rigurosos y fiables.

La participación en un programa de EEC proporciona datos e información valiosa que:

- Permite la comparación del rendimiento y los resultados entre diferentes laboratorios.
- Proporciona sistemas de detección temprana de problemas sistemáticos asociados con kits o protocolos.
- Proporciona evidencia objetiva de la calidad de las pruebas.
- Indica áreas que necesitan mejoras.
- Identifica las necesidades de capacitación.

En resumen, la EEC es importante para mejorar el sistema de gestión de calidad del laboratorio, dado que es una medida del rendimiento del laboratorio.

Al participar en los programas de EEC, el laboratorio necesita desarrollar un protocolo para la gestión del proceso (https://www.who.int/ihr/training/laboratory_quality/10_b_eqa_contents.pdf).

Un objetivo principal es asegurar que todas las muestras de la EEC se traten de la misma manera que otras muestras analizadas. Se deben desarrollar procedimientos para:

- Manejo de muestras: estas deberán registrarse, procesarse adecuadamente y almacenarse según sea necesario para su uso futuro.
- Mantenimiento de registros adecuado: los registros de todos los informes de pruebas de EEC deben mantenerse durante un periodo de tiempo, de modo que se pueda medir la mejora del rendimiento.

Conservación y destrucción de las muestras de evaluación externa de calidad

Según el artículo 61 de la Ley 14/2007⁽²⁾: "Las muestras biológicas utilizadas en investigación biomédica se conservarán únicamente en tanto sean necesarias para los fines que justificaron su recogida. La muestra sobrante deberá ser conservada, destruida o devuelta según el criterio de la agencia evaluadora externa".

Conservación de registros de evaluación externa de calidad

Se debe guardar un registro manual o electrónico que muestre cómo se ha realizado la evaluación externa, detallando qué se ha evaluado y cuándo se ha realizado la evaluación. Esto incluye las propias notas del laboratorio, así como los informes generados por el laboratorio y la agencia evaluadora externa. Estos registros se mantendrán durante un periodo de tiempo estipulado, por ejemplo 3-5 años. Estos registros deberían ser siempre precisos, detallados, legibles y estar fechados⁽⁶¹⁾.

Los informes deben mantenerse un mínimo de 2 años a partir de la fecha de la evaluación. Si se toman medidas correctivas como resultado de un resultado insatisfactorio o inaceptable, deben mantenerse también los registros de estas acciones durante 2 años⁽⁶²⁾.

4.5.2. Acreditación y certificación de laboratorios

Los laboratorios clínicos disponen de distintos sistemas de gestión de la calidad. Los más utilizados son la UNE-EN ISO 9001 (certificación) y la UNE-EN ISO 15189 (acreditación). Un laboratorio certificado demuestra que tiene implantado un sistema de gestión de la calidad, pero no avala su competencia técnica. El laboratorio acreditado en cambio demuestra que cuenta con personal competente, utiliza procedimientos técnicamente válidos, proporciona el asesoramiento necesario en la elección de pruebas y en la interpretación del resultado, y elabora informes claros y exactos.

Aunque hoy en día en España no es obligatoria la acreditación para los laboratorios de citogenética/citogenómica, es esperable que en un futuro próximo las autoridades sanitarias lo requieran, como ya sucede en otras disciplinas de laboratorio. En cualquier caso, disponer de un sistema de garantía de la calidad es muy importante porque minimiza los errores y asegura unos resultados fiables.

Una de las herramientas básicas en la gestión de la calidad son los indicadores. Los indicadores de calidad son datos objetivos y cuantificables que permiten valorar el funcionamiento de las actividades de un proceso y mejorarlo. En la tabla a continuación se proponen algunos ejemplos de indicadores específicos para un laboratorio de citogenética (Tabla 12).

Tabla 12. Propuesta de indicadores útiles para el control y seguimiento del sistema de gestión de la calidad de un laboratorio de citogenética.

| PROCESO | INDICADOR | CÁLCULO | OBJETIVO* |
|--------------------------|--|--|---|
| PREANALÍTICO | Pruebas rechazadas (según motivo) | Porcentaje de pruebas rechazadas (por muestra no identificada, incorrecta, en mal estado, etc.) | Experiencia del propio laboratorio ^(c) |
| PREANALÍTICO | Pruebas ampliadas (según motivo) | Nº pruebas ampliadas por médico solicitante / Total pruebas realizadas) x100 (Nº pruebas ampliadas por algoritmo diagnóstico / Total pruebas realizadas) x100 | Experiencia del propio laboratorio ^(c) |
| ANALÍTICO | Muestras procesadas no procedentes | Porcentaje de pruebas procesadas pero no analizadas (ausencia de infiltración tumoral, muestra reactiva, etc.) | Experiencia del propio laboratorio ^(c) |
| ANALÍTICO | Casos sin crecimiento o no valorables (se incluyen los casos con incidencia técnica) | (Nº estudios sin crecimiento / Total cariotipos realizados) x100 (Nº estudios FISH no valorables / Total estudios FISH) x100 | ≤10% ^(c) |
| ANALÍTICO | Casos alterados (por hemopatía) | (Nº casos alterados / Total cariotipos realizados de novo) x100 | Referentes bibliografía ^(b) |
| ANALÍTICO | Repetición de pruebas por error técnico | Porcentaje de estudios de FISH no valorables que se repiten, citogenéticas que no crecen y se reclutivan, etc. | <5% |
| ANALÍTICO | Control de calidad interno técnica cariotipo | Estudios de cariotipo coincidentes entre dos o más observadores | ≤5% ^(c) |
| ANALÍTICO | Control de calidad interno técnica FISH | Estudios de FISH coincidentes entre dos o más observadores | ≤5% ^(c) |
| ANALÍTICO | Control de calidad interno técnica microarrays | Estudios de microarrays coincidentes entre dos o más observadores | ≤5% ^(c) |
| POSANALÍTICO | Tiempo de entrega de resultados | Media del tiempo entre recepción y validación de la prueba | ≤ tiempo guías ^(a) |
| POSANALÍTICO | Resultados fuera de plazo | Porcentaje de pruebas validadas fuera de plazo | <5% ^(a) |
| POSANALÍTICO | Correlación con control de calidad externo | Resultados coincidentes con los resultados de referencia (GenQA y SEHH) | >90% |
| DIRECCIÓN / ORGANIZACIÓN | Carga de trabajo | Número de determinaciones/técnico | Carga según guías ^(a) |

* El objetivo o el límite de un indicador vendrá definido por guías nacionales o internacionales publicadas al respecto^(a). En caso de no disponer de dichas guías, se pueden utilizar otros referentes bibliográficos^(b) o la experiencia del propio laboratorio^(c) siempre que se pueda argumentar.

4.6. Confidencialidad

Existen una serie de cuestiones a considerar según la Ley orgánica 3/2018 de protección de datos personales y garantía de los derechos digitales (LOPD)⁽⁶³⁾.

En materia de salud, los datos personales están entre los protegidos con nivel de seguridad alto, por lo que se requiere aplicar medidas de seguridad especiales.

Son principios fundamentales en el tratamiento de datos con seguridad especial:

- Disponer de medidas que aseguren la conservación y la no alteración de los datos, y que eviten el acceso a terceros.
- Tener claramente establecidas las responsabilidades referidas al tratamiento de estos datos.

4.6.1. Conceptos básicos

- Las disposiciones de la LOPD afectan a las organizaciones, pero las obligaciones se trasladan a todo el personal.
- El personal ha de conocer el **deber de secreto** (nadie que trate con datos puede revelarlos a terceros). Este deber no tiene relación con la importancia de los datos revelados, es permanente en el tiempo y sigue en vigor una vez finalizada la relación contractual con el centro donde se accedió a los datos.
- Han de protegerse todos los datos personales registrados en cualquier soporte o no registrados.
- Debe combatirse la recopilación y conservación de datos sin razón conocida ni justificada, no recoger datos excesivos y destruirlos cuando no sean necesarios.
- Debe disponerse de un documento que establezca las medidas, las normas y los procedimientos que afectan a los ficheros automatizados, en papel o en cualquier otro soporte, lugares de trabajo, equipos, sistemas y programas que intervienen en el tratamiento de datos.
- Debe disponerse de un acuerdo con todas las entidades a las que se da servicio, consistente en un "contrato de encargado del tratamiento de datos". Las entidades titulares de los ficheros, por encargo de las cuales se realiza el tratamiento de datos, transmiten a la agencia de protección de datos los correspondientes formularios de inscripción.
- Debe disponerse de un documento donde se recoja el "registro de actividades de tratamiento", que idealmente ha de revisarse por un asesor jurídico y ser sometido a auditoría.
- Es obligado contar con un delegado de protección de datos (DPD) y debe designarse un responsable de seguridad, encargado de coordinar y gestionar las medidas de seguridad definidas por el responsable de los ficheros y por el DPD.

4.6.2. Archivos informatizados

- Se recomienda que los archivos en papel sean informatizados.
- Los registrados en el sistema informático de laboratorio (SIL): cada trabajador registrado accede mediante una clave de usuario y contraseña, con nivel de seguridad alto. Se da acceso a las personas autorizadas con un sistema de perfil de usuario que permite acotar el acceso a los datos en función del área de trabajo. Se realizan controles aleatorios de la consulta innecesaria de datos.
- Los registrados en otros sistemas (de tipo libros de Excel u otras bases de datos) deben protegerse con contraseñas seguras.
- Cuando es posible, la transmisión de resultados analíticos se realiza mediante integraciones informáticas entre el SIL y los clientes. Como en cualquier envío de datos sensibles a través de redes de comunicación, ha de garantizarse la confidencialidad mediante protocolos seguros.
- Debe evitarse el uso de correo electrónico como sistema de transmisión de información. Si se utiliza para el envío de datos de nivel alto, ha de hacerse cifrando la comunicación.

4.6.3. Archivos en papel

Debe seguirse la recomendación general de evitar la recopilación y conservación de datos sin justificación, y cuando ya no sean necesarios deben destruirse de manera segura (contenedores específicos para tal fin o destructores de papel).

Si se utilizan otros documentos en papel como hojas de trabajo, se recomienda, ya que no se recoge normativa suficientemente específica en la ley, que se custodien bajo llave cuando dejen de utilizarse.

Respecto al posible envío de estos documentos en papel, se recomienda que:

- Se haga únicamente mediante la utilización de los servicios de empresas especializadas en mensajería de seguridad o mediante valija interna, garantizando las medidas de seguridad dirigidas a impedir el acceso o la manipulación de la información objeto de traslado.
- El personal que puede realizar la transmisión debe ser el asignado en cada centro.
- Se recomienda que cualquier envío diferente a los establecidos se notifique al responsable del fichero y/o responsable de seguridad como una incidencia de seguridad.

5. Bibliografía

1. Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. BOE-A-2002-22188. [Internet]. 2002 [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2002/BOE-A-2002-22188-consolidado.pdf>.
2. Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. BOE-A-2007-12945. [Internet]. 2007 [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2007/BOE-A-2007-12945-consolidado.pdf>.
3. Texto enmendado de los Anejos A y B del Acuerdo Europeo sobre transporte internacional de mercancías peligrosas por carretera (ADR 2019) con las Enmiendas adoptadas durante las sesiones 100.^a, 101.^a, 102.^a, 103.^a y 104.^a del Grupo de trabajo de transporte. BOE-A-2019-9661 [Internet]. 2019 [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.boe.es/boe/dias/2019/06/28/pdfs/BOE-A-2019-9661.pdf>.
4. Resolución de 5 de julio de 2004, de la Secretaría General Técnica, relativa al Acuerdo Multilateral M-143 en virtud de la Sección 1.5.1 del Acuerdo Europeo sobre Transporte de Mercancías Peligrosas por Carretera (ADR). BOE. 15 julio 2004 núm. 170 [Internet]. 2004 [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.boe.es/boe/dias/2004/07/15/pdfs/A25836-25837.pdf>.
5. Corrección de errores del Texto enmendado de los Anejos A y B del Acuerdo Europeo sobre transporte internacional de mercancías peligrosas por carretera (ADR 2019) con las Enmiendas adoptadas durante las sesiones 100.^a, 101.^a, 102.^a, 103.^a y 104.^a del Grupo de trabajo de transportes de mercancías peligrosas de la Comisión Económica para Europa de las Naciones Unidas (CEPE). BOE-A-2019-10594 [Internet]. 2019 [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.boe.es/boe/dias/2019/07/19/pdfs/BOE-A-2019-10594.pdf>.
6. Hastings R, Howell R, Bricarelli D, Kristoffersson U, Cavani S. General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics. A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society. European Cytogeneticists Association Newsletter. 2012;29.
7. Ley 25/2009, de 22 de diciembre, de modificación de diversas leyes para su adaptación a la Ley sobre el libre acceso a las actividades de servicios y su ejercicio. BOE-A-2009-20725. [Internet]. 2009 [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2009-20725>.
8. Ley 2/1974, de 13 de febrero, sobre Colegios Profesionales. BOE-A-1974-289. [Internet]. 1974 [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1974-289>.
9. Directiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de septiembre de 2000, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. DOUE-L-2000-81929. [Internet]. 2000 [cited 2020 Aug 26]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2000-81929>.
10. Directiva 93/68 del Consejo, de 22 de julio de 1993, por la que modifica las Directivas 87/404/CEE (recipientes a presión simples), 88/378/CEE (seguridad de los juguetes), 89/106/CEE (productos en construcción), 89/336/CEE (compatibilidad electromagnética), 89/392/CEE (máquinas), 89/686/CEE (equipos de protección individual), 90/384/CEE (instrumentos de pesaje de funcionamiento no automático), 90/385/CEE (productos sanitarios implantables activos), 90/396/CEE (aparatos gas), 91/263/CEE (equipos terminales telecomunicación), 92/42/CEE (calderas nuevas de agua caliente alimentadas con combustibles líquidos o gaseosos) y 73/23/CEE (material eléctrico destinado a utilizarse con determinados límites de tensión). DOUE-L-1993-81403 [Internet]. 1993 [cited 2020 Aug 26]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1993-81403>.

11. UNE-EN 12469:2001. Biotecnología. Criterios de funcionamiento para las cabinas de seguridad microbiológica. UNE [Internet]. 2001 [cited 2020 Aug 26]. Available from: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?-c=N0024115>.
12. UNE-EN 14175-2:2003 Vitrinas de gases. Parte 2: Requisitos de seguridad y de funcionamiento. UNE [Internet]. 2003 [cited 2020 Aug 26]. Available from: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0029790>.
13. UNE-CEN/TS 14175-5:2009 EX Vitrinas de gases. Parte 5: Recomendaciones para la instalación y el mantenimiento. UNE [Internet]. 2009 [cited 2020 Aug 26]. Available from: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?-c=N0042903>.
14. Real Decreto 665/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo. BOE-A-1997-11145. [Internet]. 1997 [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1997-11145>.
15. Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo. BOE-A-2001-8436. [Internet]. 2001 [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2001-8436>.
16. Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas. Guía sobre fichas de datos de seguridad y escenarios de exposición. ECHA [Internet]. 2018. pp. 1-86. Available from: https://echa.europa.eu/documents/10162/22786913/sds_es_guide_es.pdf/e256e6b5-df54-087c-1eca-4580b0ed92d3.
17. Real Decreto 656/2017, de 23 de junio, por el que se aprueba el Reglamento de Almacenamiento de Productos Químicos y sus Instrucciones Técnicas Complementarias MIE APQ 0 a 10. BOE-A-2017-8755. [Internet]. 2017. [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2017-8755>.
18. Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006. DOUE-L-2008-82637 [Internet]. 2008 [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2008-82637>.
19. Canalejas Pérez P, Gadea Carrera E, Solórzano Fábrega M. Notas Técnicas de Prevención: Gestión de residuos sanitarios. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo [Internet]. 2009. Available at: <https://www.insst.es/documents/94886/328096/838+web.pdf/66e04a8f-f3d5-485d-8a4c-1062e51d971f>.
20. Decreto 2263/1974, de 20 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de Policía Sanitaria Mortuoria. BOE-A-1974-1358. [Internet]. 1974 [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1974-1358&p=20141203&tn=3>.
21. Real Decreto 100/2011, de 28 de enero, por el que se actualiza el catálogo de actividades potencialmente contaminadoras de la atmósfera y se establecen las disposiciones básicas para su aplicación. BOE-A-2011-1643. [Internet]. 2011 [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2011-1643>.
22. Real Decreto 833/1988, de 20 de julio, por el que se aprueba el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986, Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos. BOE-A-1988-18848. [Internet]. 1988 [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1988-18848>.
23. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. BOE-A-2011-13046. [Internet]. 2016 [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2011/BOE-A-2011-13046-consolidado.pdf>.
24. Ley 11/1997, de 24 de abril, de Envases y Residuos de Envases. BOE-A-1997-8875. [Internet]. 1997 [cited 2020 Aug 29]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1997-8875>.
25. Ley 21/2013, de 9 de diciembre, de evaluación ambiental. BOE-A-2013-12913. [Internet]. 2013 [cited 2020 Aug 29]. Available from: https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2013-12913.
26. Nussbaum RL, Mcinnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 7th ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2007.
27. ISCN 2020. McGowan-Jordan J, Hastings RJ, Moore S (eds). ISCN 2020. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature, Karger; 2020. ISBN: 978-3-318-06706-4
28. Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, Beverloo HB, Costa D, Espinet B, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia*. 2019 Aug;33(8):1851-67. PMID: 30696948.
29. Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet*. 1977 Jan;29(1):94-7. PMID: 835578.
30. Schanz J, Cevik N, Fonatsch C, Brault F, Shirneshan K, Bacher U, Haase D. Detailed analysis of clonal evolution and cytogenetic evolution patterns in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and related myeloid disorders. *Blood Cancer J*. 2018 Mar 7;8(3):28. PMID: 29515104.

31. Chun K, Hagemeijer A, Iqbal A, Slovak ML. Implementation of standardized international karyotype scoring practices is needed to provide uniform and systematic evaluation for patients with myelodysplastic syndrome using IPSS criteria: An International Working Group on MDS Cytogenetics Study. *Leuk Res.* 2010 Feb;34(2):160-5. PMID: 19665225.
32. Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res.* 2009 Jul 31;668(1-2):4-10. PMID: 19622403.
33. Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr Protoc Hum Genet.* 2015 Apr 1;85:8.7.1-8.7.17. PMID: 25827349.
34. Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA, Oostra AB, Veerman AJP, Van Weel M, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet.* 1997 May-Jun;5(3):137-48. PMID: 9272737.
35. Soulier J, Leblanc T, Larghero J, Dastot H, Shimamura A, Guardiola P, et al. Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. *Blood.* 2005 Feb 1;105(3):1329-36. PMID: 15383454.
36. Castella M, Pujol R, Callén E, Ramírez MJ, Casado JA, Talavera M, et al. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J Med Genet.* 2011 Apr;48(4):242-50. PMID: 21217111.
37. Ventura RA, Martín-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn.* 2006 May;8(2):141-51. PMID: 16645199.
38. Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, et al.; Association for Molecular Pathology Clinical Practice Committee; American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. *J Mol Diagn.* 2007 Apr;9(2):134-43. PMID: 17384204.
39. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, Ketterling RP, Olson SB, Quigley DI, et al.; Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. *Genet Med.* 2011 Jul;13(7):667-75. PMID: 21738013.
40. Professional Standards Committee. Association of Clinical Cytogeneticists. FISH scoring in oncology. Association of Clinical Cytogeneticists [Internet]. 2003 [cited 2020 Sep 15]. Available from: <http://www.aegh.org/web/docs/FISH%20scoring%20in%20Oncology.pdf>.
41. Zneimer SM. Validation of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) for Chromosome 5 Monosomy and Deletion. *Curr Protoc Hum Genet.* 2020 Mar;105(1):e96. PMID: 31922364.
42. European Cytogeneticists Association. FISH on histological sections of solid tumors. *European Cytogeneticists Association Newsletter.* 2012;29.
43. Ciolino AL, Tang ME, Bryant R. Statistical treatment of fluorescence in situ hybridization validation data to generate normal reference ranges using Excel functions. *J Mol Diagn.* 2009 Jul;11(4):330-3. PMID: 19525336.
44. Du Q, Li Q, Sun D, Chen X, Yu B, Ying Y. Calibration of interphase fluorescence in situ hybridization cutoff by mathematical models. *Cytometry A.* 2016 Mar;89(3):239-45. PMID: 26580488.
45. Reddy KS, Tripodi J. Contemplations on preclinical validation of fluorescence in situ hybridization probe assay for paraffin-embedded tissues in hematologic disorders. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008 May;183(1):1-5. PMID: 18474289.
46. Safavi S, Hansson M, Karlsson K, Biloglav A, Johansson B, Paulsson K. Novel gene targets detected by genomic profiling in a consecutive series of 126 adults with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2015 Jan;100(1):55-61. PMID: 25261097.
47. Puiggros A, Puigdecenet E, Salido M, Ferrer A, Abella E, Gimeno E, et al. Genomic arrays in chronic lymphocytic leukemia routine clinical practice: are we ready to substitute conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization techniques? *Leuk Lymphoma.* 2013 May;54(5):986-95. PMID: 22994157.
48. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, Gouraud W, Charbonnel C, Harousseau JL, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2009 Sep 20;27(27):4585-90. PMID: 19687334.
49. Zaliova M, Stuchly J, Winkowska L, Musilova A, Fiser K, Slamova M, et al. Genomic landscape of pediatric B-other acute lymphoblastic leukemia in a consecutive European cohort. *Haematologica.* 2019 Jul;104(7):1396-406. PMID: 30630978.
50. Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood.* 2008 Feb 1;111(3):1534-42. PMID: 17954704.
51. Leeksa AC, Baliakas P, Moysiadis T, Puiggros A, Plevova K, van der Kevie-Kersemaekers AM, et al. Genomic arrays identify high-risk chronic lymphocytic leukemia with genomic complexity: a multi-center study. *Haematologica.* 2020 Jan 23;haematol.2019.239947. Epub ahead of print. PMID: 31974198.
52. Cooley LD, Lebo M, Li MM, Slovak ML, Wolff DJ; Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee. American College of Medical Genetics and Genomics technical standards and guidelines: microarray analysis for chromosome abnormalities in neoplastic disorders. *Genet Med.* 2013 Jun;15(6):484-94. PMID: 23619274.

53. Schoumans J, Suela J, Hastings R, Muehlematter D, Rack K, van den Berg E, et al. Guidelines for genomic array analysis in acquired haematological neoplastic disorders. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016 May;55(5):480-91. PMID: 26774012.
54. Real Decreto 1093/2010, de 3 de septiembre, por el que se aprueba el conjunto mínimo de datos de los informes clínicos en el Sistema Nacional de Salud. BOE A-2010-14199 [Internet]. 2010 [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2010/BOE-A-2010-14199-consolidado.pdf>.
55. ISO 15189:2012. Medical laboratories — Requirements for quality and competence [Internet]. 2012 [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.iso.org/standard/56115.html>.
56. Bruford EA, Braschi B, Denny P, Jones TEM, Seal RL, Tweedie S. Guidelines for human gene nomenclature. *Nat Genet*. 2020 Aug;52(8):754-8. PMID: 32747822.
57. Cluzeau T, Moreilhon C, Mounier N, Karsenti JM, Gastaud L, Garnier G, et al. Total genomic alteration as measured by SNP-array-based molecular karyotyping is predictive of overall survival in a cohort of MDS or AML patients treated with azacitidine. *Blood Cancer J*. 2013 Nov 1;3(11):e155. PMID: 24185502.
58. Arenillas L, Mallo M, Ramos F, Guinta K, Barragán E, Lumbreras E, et al. Single nucleotide polymorphism array karyotyping: a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes with unsuccessful conventional cytogenetic testing. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 Dec;52(12):1167-77. PMID: 24123380.
59. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. (eds.). WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC; 2017.
60. Ley 19/2015, de 13 de julio, de medidas de reforma administrativa en el ámbito de la Administración de Justicia y del Registro Civil. BOE-A-2015-7851 [Internet]. 2015 [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.boe.es/boe/dias/2015/07/14/pdfs/BOE-A-2015-7851.pdf>.
61. Gravells A. Principles and Practices of Quality Assurance: A guide for internal and external quality assurers in the FE and Skills Sector. London: Learning Matters - SAGE Publications; 2016.
62. Mahler Zneimer S. Cytogenetic Laboratory Management: Chromosomal, FISH and Microarray-Based Best Practices and Procedures. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2017.
63. Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. BOE-A-2018-16673 [Internet]. 2019 [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2018/BOE-A-2018-16673-consolidado.pdf>.

Anexo 1. Modelo de consentimiento informado para la realización de pruebas genéticas diagnósticas

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Solicitamos su consentimiento para:

1. Realizar pruebas genéticas de laboratorio en muestras biológicas (especificar muestra)..... con la finalidad de diagnosticar si es afecto o portador de.....
2. Estas pruebas se realizarán en el laboratorio.....
3. Únicamente el personal sanitario debidamente autorizado del laboratorio y del Hospital podrá acceder a los datos personales y a los resultados de las pruebas genéticas.
4. El facultativo que solicita estas pruebas adquiere el compromiso de proporcionarle información del objeto de las mismas y facilitarle el asesoramiento genético, o bien derivarlo a una unidad de consejo genético.
5. Existe la posibilidad de que las pruebas proporcionen información no directamente relacionada con el objeto del análisis y usted puede decidir si desea o no que se le comunique:
Deseo ser informada/o No deseo ser informada/o
6. La información obtenida puede ser relevante para sus familiares. Si se da este caso, se le informará a usted de por qué es importante que la conozcan. Será decisión personal suya decidir si los informa, con la finalidad de que, si ellos lo desean, puedan acceder a una consulta especializada en genética, donde les informarán sobre su riesgo personal y sus opciones de salud en el futuro.
7. Una vez finalizado el análisis, los datos obtenidos y las muestras excedentes se guardarán en el laboratorio , por el interés que puedan tener para satisfacer futuras necesidades asistenciales, suyas y de sus familiares.

Si ha entendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pueda tener y otorga su consentimiento para realizar las pruebas genéticas en los términos antes especificados, por favor, firme a continuación este consentimiento informado en sentido afirmativo:

Yo (paciente/padre o madre del paciente/tutor legal del paciente)

Declaro que he sido informado de que (persona de quien se obtiene la muestra)

Podría estar afectado/a de o ser portador/a de una alteración genética y que el diagnóstico se basa en los resultados de las pruebas genéticas. Doy mi consentimiento para realizar las citadas pruebas genéticas en el servicio de laboratorio en el Hospitaly, en caso necesario, en otros laboratorios designados por los mismos para ayudar en el proceso diagnóstico.

....., a de de 20.....

Firma (paciente/padre o madre/tutor legal)

Firma (profesional autorizado que solicita el consentimiento)

Este documento ha sido revisado y autorizado por el Comité de Ética del Hospital con fecha

Anexo 2. Informe de resultados citogenéticos. Cariotipo

| | | |
|---|--|--|
| DATOS DE LA INSTITUCIÓN EMISORA DEL INFORME | | Dirección completa del centro (tipo de vía, nombre de la vía, número de la vía, número, código postal, municipio, provincia, país, teléfono) <i>Servicio y/o unidad</i> |
| Logo y denominación del servicio de salud | Logo y denominación del centro | |
| INFORME DE RESULTADOS CITOGENÉTICOS, CARIOTIPO | | |
| DATOS DEL PACIENTE | | |
| Nombre y apellidos | Fecha nacimiento (dd/mm/aaaa) | |
| Sexo (H/M) | Número de historia clínica | |
| Diagnóstico | Situación del paciente (diagnóstico, progresión, recaída) | |
| DATOS DEL SOLICITANTE | | |
| Nombre y apellidos del solicitante. | Categoría profesional | |
| Denominación del centro solicitante. | Servicio/Unidad | |
| Denominación del servicio de salud | | |
| DATOS DE LA MUESTRA | | |
| N.º de identificación de la muestra | Fecha de toma de la muestra (dd/mm/aaaa) | |
| Tipo de muestra (médula ósea –MO–, sangre periférica –SP–, ganglio, líquido biológico) | | |
| METODOLOGÍA EMPLEADA CARIOTIPO | | |
| Tipo de cultivo (medio de cultivo, tiempo de incubación)/Método directo | | |
| Estimulación (sí/no). Tipo de estimulación | | |
| Bandeado cromosómico (bandas G, R...) | | |
| RESULTADOS | | |
| N.º de metafases analizadas | | |
| Fórmula cromosómica (International System for Human Cytogenetic Nomenclature –ISCN–) | | |
| <u>Descripción de los resultados/Comentarios:</u> | | |
| <ul style="list-style-type: none">• Describir los distintos clones observados• Señalar los genes significativos (nomenclatura HUGO) situados en los loci implicados en cualquier alteración recurrente observada• Consecuencias clínicas de las alteraciones genéticas encontradas• Indicar cualquier otra prueba necesaria para clarificar los resultados obtenidos (por ejemplo, hibridación in situ fluorescente –FISH–)• Causas de muestras no valorables | | |
| * El resultado no garantiza la ausencia de anomalías cromosómicas que se encuentren por debajo del límite de resolución de la técnica (10 Mb) | | |
| ** La interpretación final de los resultados requiere del contexto clínico del paciente | | |
| Firma del responsable 1 (Nombre y apellidos. Categoría profesional) Fecha de Informe (dd/mm/aaaa) | Firma del responsable 1 (Nombre y apellidos. Categoría profesional) Fecha de Informe (dd/mm/aaaa) | |
| <i>Siempre se debe paginar</i> | | |

Anexo 3. Informe de resultados citogenéticos. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

| | | |
|--|--|--|
| DATOS DE LA INSTITUCIÓN EMISORA DEL INFORME | | Dirección completa del centro (tipo de vía, nombre de la vía, número de la vía, número, código postal, municipio, provincia, país, teléfono) |
| Logo y denominación del servicio de salud | Logo y denominación del centro | <i>Servicio y/o unidad</i> |
| INFORME DE RESULTADOS CITOGÉNÉTICOS, FISH | | |
| DATOS DEL PACIENTE | | |
| Nombre y apellidos | Fecha nacimiento (dd/mm/aaaa) | |
| Sexo (H/M) | Número de historia clínica | |
| Diagnóstico | Situación del paciente (diagnóstico, progresión, recaída) | |
| DATOS DEL SOLICITANTE | | |
| Nombre y apellidos del solicitante. | Categoría profesional | |
| Denominación del centro solicitante. | Servicio/Unidad | |
| Denominación del servicio de salud | | |
| DATOS DE LA MUESTRA | | |
| N.º de identificación de la muestra | Fecha de toma de la muestra (dd/mm/aaaa) | |
| Tipo de muestra (médula ósea –MO–, sangre periférica –SP–, ganglio, líquido biológico) | | |
| METODOLOGÍA EMPLEADA FISH | | |
| Procedencia de las células analizadas (fijadas/impronta/selección/parafina...) | | |
| Designar si es estudio en interfase o metafase | | |
| RESULTADOS | | |
| Fórmula FISH (International System for Human Cytogenetic Nomenclature –ISCN–) | | |
| Descripción de los resultados/Comentarios: | | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Describir células analizadas y los clones observados • Relacionar genes (nomenclatura HUGO) y cromosomas • <i>Cut-off</i> y nombre del fabricante de la sonda • Igual que en el cariotipo, consecuencias clínicas, pruebas complementarias • Causas de no valoración | | |
| * Limitación de la técnica: la especificidad y la sensibilidad dependerán del diseño de la sonda | | |
| ** La interpretación final de los resultados requiere del contexto clínico del paciente | | |
| Firma del responsable 1 (Nombre y apellidos. Categoría profesional) Fecha de Informe (dd/mm/aaaa) | Firma del responsable 1 (Nombre y apellidos. Categoría profesional) Fecha de Informe (dd/mm/aaaa) | |
| <i>Siempre se debe paginar</i> | | |

Anexo 4. Informe de resultados citogenéticos. *Microarrays*

DATOS DE LA INSTITUCIÓN EMISORA DEL INFORME

Logo y denominación
del servicio de salud

Logo y denominación
del centro

Dirección completa del centro
(tipo de vía, nombre de la vía, número de
la vía, número, código postal, municipio,
provincia, país, teléfono)
Servicio y/o unidad

INFORME DE RESULTADOS CITOGENÉTICOS, *MICROARRAYS*

DATOS DEL PACIENTE

Nombre y apellidos

Fecha nacimiento (dd/mm/aaaa)

Sexo (H/M)

Número de historia clínica

Diagnóstico

Situación del paciente (diagnóstico, progresión, recaída)

DATOS DEL SOLICITANTE

Nombre y apellidos del solicitante.

Categoría profesional

Denominación del centro solicitante.

Servicio/Unidad

Denominación del servicio de salud

DATOS DE LA MUESTRA

N.º de identificación de la muestra

Fecha de toma de la muestra (dd/mm/aaaa)

Tipo de muestra (médula ósea –MO–, sangre periférica –SP–, ganglio, líquido biológico)

METODOLOGÍA EMPLEADA ARRAY

Tipo de muestra. Especificaciones técnicas del *microarray* y del *software* de análisis. Método de análisis o filtrado. Información sobre los controles de calidad. Criterios aplicados para los distintos tipos de alteraciones del número de copias (CNA)

RESULTADOS

Fórmula *microarray* (International System for Human Cytogenetic Nomenclature –ISCN–)

Descripción de los resultados/Comentarios:

- Descripción de las alteraciones encontradas (en formato tabla o texto)
- Interpretación de los resultados para correlacionarlos con el diagnóstico y/o el pronóstico
- Recomendación de técnicas adicionales para confirmación del resultado

* El *microarray* no permite detectar reordenamientos cromosómicos equilibrados, mosaicos de porcentaje bajo ni alteraciones más pequeñas que la resolución del *microarray*. La relevancia y el significado de las anomalías cromosómicas detectadas, así como las posibles variantes polimórficas, se interpretan según los criterios y las fuentes de información actuales, que pueden cambiar posteriormente a la fecha de emisión del informe.

** La interpretación final de los resultados requiere del contexto clínico del paciente

Firma del responsable 1

(Nombre y apellidos. Categoría profesional)

Fecha de Informe (dd/mm/aaaa)

Firma del responsable 1

(Nombre y apellidos. Categoría profesional)

Fecha de Informe (dd/mm/aaaa)

Siempre se debe pagar

Anexo 5. Informe de fragilidad cromosómica (estudio de la anemia de Fanconi)

| | | |
|---|--|--|
| DATOS DE LA INSTITUCIÓN EMISORA DEL INFORME | | Dirección completa del centro (tipo de vía, nombre de la vía, número de la vía, número, código postal, municipio, provincia, país, teléfono) <i>Servicio y/o unidad</i> |
| Logo y denominación del servicio de salud | Logo y denominación del centro | |
| INFORME DE FRAGILIDAD CROMOSÓMICA (estudio de Anemia de Fanconi) | | |
| DATOS DEL PACIENTE | | |
| Nombre y apellidos | | Fecha nacimiento (dd/mm/aaaa) |
| Sexo (H/M) | | Número de historia clínica |
| Antecedente familiar de Anemia de Fanconi: Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | | |
| DATOS DEL SOLICITANTE | | |
| Nombre y apellidos del solicitante. | | Categoría profesional |
| Denominación del centro solicitante. | | Servicio/Unidad. Denominación del servicio de salud |
| DATOS DE LA MUESTRA | | |
| N.º de identificación de la muestra | | Fecha de toma de la muestra (dd/mm/aaaa) |
| Tipo de muestra: sangre periférica | | |
| METODOLOGÍA EMPLEADA ARRAY | | |
| Test de fragilidad cromosómica inducida por diepoxibutano (DEB) | | |
| RESULTADOS | | |
| <u>Sin tratamiento:</u> | <ul style="list-style-type: none"> • Número de metafases estudiadas • % de células con roturas • Número de intercambios cromatídicos (figuras radiales) • Número medio de roturas por célula • Número medio de roturas por célula aberrante | |
| <u>Tratado con DEB:</u> | <ul style="list-style-type: none"> • Número de metafases estudiadas • % de células con roturas • Número de intercambios cromatídicos (figuras radiales) • Número medio de roturas por célula • Número medio de roturas por célula aberrante | |
| Indicar: | | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Si el test de fragilidad cromosómica es negativo/positivo (compatible con anemia de Fanconi*) • Si el resultado es positivo solo en una fracción de las células analizadas (presencia de mosaicismo**) | | |
| <p>* La anemia de Fanconi es, en más del 99% de los casos, una enfermedad genética autosómica recesiva, por lo que es conveniente descartar la enfermedad en todos los hermanos. Al ser ambos padres biológicos portadores de la enfermedad, el riesgo de anemia de Fanconi en subsiguientes embarazos es del 25%. El diagnóstico prenatal es posible en esta enfermedad. Puede encontrar información adicional sobre la enfermedad en: http://anemiadefanconi.org/.</p> <p>**Mosaicismo indica que el paciente está afecto de anemia de Fanconi, pero tiene 2 subpoblaciones de células en sangre: una con fragilidad cromosómica y otra que, debido a reversión espontánea, no presenta fragilidad cromosómica.</p> | | |
| Firma del responsable 1 (Nombre y apellidos. Categoría profesional) Fecha de Informe (dd/mm/aaaa) | Firma del responsable 1 (Nombre y apellidos. Categoría profesional) Fecha de Informe (dd/mm/aaaa) | |
| <i>Siempre se debe pagar</i> | | |

