

Uso deseado

La prueba FetalAMP es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa del gen SRY perteneciente al cromosoma Y en plasma sanguíneo de mujeres embarazadas de entre 8-12 semanas.

Resumen

Los cromosomas son unas estructuras que contienen toda la información genética del individuo, en el caso del ser humano son un total de 23 pares, aunque solo un par (XX o XY) será el responsable de definir el sexo durante el desarrollo de su vida intrauterina [1]. El sexo se define al momento de la fecundación pues el espermatozoide contiene el cromosoma que definirá el sexo siendo Y para masculino y X para femenino, ya que el ovulo solo contiene el cromosoma X. El gen SRY (región determinante del sexo del cromosoma Y) está presente únicamente en el cromosoma Y, este tiene la función de activar otro gen conocido como Sox9 el cual es necesario para iniciar y dirigir una serie de expresiones génicas para la diferenciación del aparato reproductor, en otras palabras, se formará un pene si el gen SRY está presente y una vagina cuando está ausente [2], todo este proceso inicia alrededor de los días 41 y 44 post-ovulación [3]. Debido a su esencial importancia es que este gen ha sido utilizado para determinar el sexo del bebé en mujeres embarazadas demostrando una alta fiabilidad desde las semanas 8-12, esto a unido a que es posible encontrar ADN fetal producto de la apoptosis durante el desarrollo embrionario llegando a encontrarlo en la sangre de la madre como ADN circulante (biopsia líquida) hasta en un 10% del total, lo que convierte a este método en uno de los menos invasivos tanto para la madre como para el bebé [4,5,6]. El ADN circulante fetal es posible detectarlo por técnicas de biología molecular como la secuenciación, la PCR en tiempo real o PCR con fundamento isotérmico con una alta sensibilidad y especificidad [6].

Principio

La prueba FetalAMP es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa del gen SRY perteneciente al cromosoma Y en muestras de plasma sanguíneo de mujeres embarazadas desde las 8 a 12 semanas. La prueba FetalAMP posee dos regiones: la primera es la región control (C) que tiene impresos anticuerpos anti-ratón y una segunda región de prueba (T) en la que se encuentran impresos anticuerpos anti-biotina, la prueba también cuenta con un conjugado que contiene partículas recubiertas con anticuerpos anti-fluoresceína. Una vez que la muestra es obtenida y procesada mediante el pretratamiento enzimático donde se marcará con biotina y fluoresceína el gen SRY, una vez concluido el pretratamiento se diluye en el reactivo de corrimiento en el cual se colocará la prueba FetalAMP para que la muestra migre a través de esta por acción capilar. Si la muestra contiene el gen SRY en una concentración superior al límite de detección, este reaccionará con las partículas recubiertas de anticuerpos anti-fluoresceína presentes en el conjugado, luego continuará migrando hasta encontrarse con los anticuerpos anti-biotina en la región de prueba (T), estos reaccionarán formando una línea de color en la región de prueba (T), esto indica un resultado positivo (sexo masculino). Por el contrario, si la muestra no contiene el gen SRY está por debajo del límite de detección no se formará la línea de color en la región de prueba (T), esto indica un resultado negativo (sexo femenino). La prueba posee un control (C) que indica que se ha agregado la cantidad de muestra correcta y el procedimiento se ha realizado con éxito.

Materiales

Incluidos (según presentación):

Presentación / Material	10 reacciones / cantidad	20 reacciones / cantidad	30 reacciones / cantidad
Instructivo de uso	1 pieza	1 pieza	1 pieza
Reactivo seco	10 tubos	20 tubos	30 tubos
Tubos con reactivo de corrimiento	10 tubos	20 tubos	30 tubos
Tira LF	10 tiras	20 tiras	30 tiras
Reactivo diluyente	1 tubo/ 250 µL	1 tubo/ 500 µL	1 tubo/ 750 µL
Control negativo	1 tubo/ 25 µL	1 tubo/ 50 µL	1 tubo/ 75 µL
Control positivo	1 tubo/ 25 µL	1 tubo/ 50 µL	1 tubo/ 75 µL

No incluidos:

- Kit de purificación de ADN
- Cronómetro
- Contenedor de RPBI
- Micropipetas
- Puntas nuevas y estériles para micropipeta
- Termobloque, baño seco o incubador
- Guantes de nitrilo
- Equipo de protección personal
- Material para toma de muestra

Recolección de la muestra

- Recolecte por venopunción sangre periférica empleando tubos con anticoagulante (EDTA o heparina) o dedicados para obtener ADN circulante, separe por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos para proceder con el proceso de purificación de ADN circulante.

Almacenamiento de la muestra

- Una vez colectada la muestra y separado el plasma solo puede almacenarse hasta por dos horas a temperatura ambiente y hasta por 7 días en refrigeración (4 °C).
- Solo almacene la muestra a -20 °C si su almacenamiento será a largo plazo previamente separado el plasma de los eritrocitos.
- El ADN circulante purificado debe almacenarse a temperatura <-20 °C para su uso a largo plazo.
- Para un mejor desempeño, analice las muestras inmediatamente después de su recolección, una manipulación, almacenamiento o transporte incorrecto puede generar desviaciones en los resultados.

Preparación de la muestra

Realice la purificación de la muestra para obtener resultados ciertos y tener una mayor sensibilidad en el ensayo.

• Purificación de ADN circulante:

Purifique el ADN circulante de la muestra siguiendo las instrucciones indicadas por fabricante del kit de purificación, al final eluya el ADN purificado (preferentemente) en H₂O grado biología molecular, libre de nucleasas o Tris-HCl 10 mM pH 8.

Instrucciones de uso

Permita que cada uno de los materiales/reactivos y muestra (ADN purificado) alcancen temperatura ambiente (preferentemente 20°C) antes de utilizarlos y prepare una superficie plana y limpia.

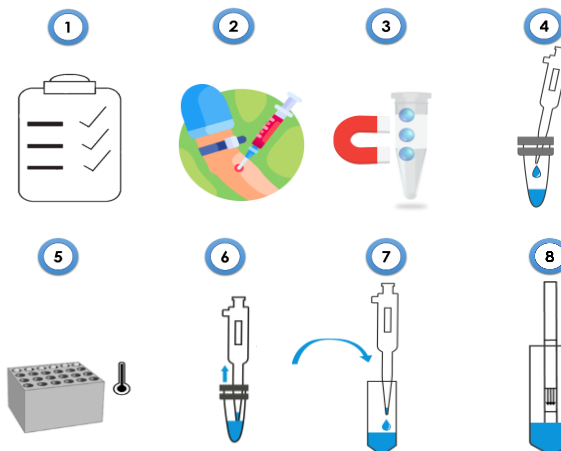
Permita que los componentes se atemperen o alcancen temperatura ambiente (18-30 °C) antes de su uso. Prepare una superficie limpia y nivelada para realizar el procedimiento.

1. Reconozca cada uno de los materiales y asegúrese que cuenta con todo lo necesario.
2. Recolecte la muestra cómo se menciona en la sección 'recolección de la muestra'.
3. Prepare la muestra cómo se indica en la sección 'preparación de la muestra'.
4. Pretratamiento de forma independiente para cada tubo:
 - **Control positivo (C+):** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco, luego 5 µL de control positivo y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con C+.
 - **Control negativo (C-):** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco, luego 5 µL de control negativo y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con C-.
 - **Muestra:** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco, luego 5 µL de muestra y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con M1.

Nota: se recomienda realizar duplicados (dos tubos de cada uno) por cada muestra a analizar. Cualquier cambio en el volumen de los reactivos, muestras o controles puede generar resultados erróneos.

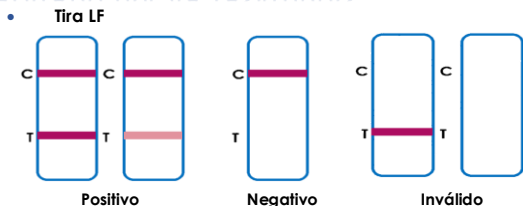
5. Coloque los tubos generados a 65 °C por 30 minutos en alguno de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador. Al finalizar saque los tubos del equipo.
6. Recolecte 10 µL de uno de los tubos del paso anterior (paso 5).
7. Transfiera los 10 µL recolectados previamente a un tubo de reactivo de corrimiento, homogenice por vortex o pipeteo y rotule como C+, C- o M1 según el tubo donde recolectó los 10 µL. (Repita este paso para los tubos restantes siendo un tubo por separado).
8. Saque una Tira LF (o más según el número de tubos preparados del paso 7) de su contenedor y colóquela en un tubo con reactivo de corrimiento preparado en el punto anterior e Inicie un temporizador.
9. Después de 5 minutos saque la tira del tubo, colóquela sobre una superficie limpia e interprete resultados.

NOTA: No interprete resultados después de 8 minutos.



ATENCIÓN: Un esquema simplificado de las instrucciones de uso se encuentran detallados e ilustrados en la página 3 de 3 de este instructivo.

Interpretación de resultados



Emita un dictamen en función de la siguiente tabla:

Control positivo	Resultado: Se visualiza una línea de color en la región de control (C) y otra línea de color en la región de prueba (T). Un resultado positivo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
Control negativo	Resultado: Únicamente se visualiza una línea de color en la región de control (C). Un resultado negativo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
Muestra	Positivo: Se visualiza una línea de color en la región de control (C) y otra línea de color en la región de prueba (T). Este resultado indica que se detectó el gen SRY. Negativo: Se visualiza una línea de color en la región de control (C). No se observa ninguna línea de color en la región de prueba (T). Un resultado negativo indica que no se detectó el gen SRY.
Inválido	No se visualiza la línea de color en la región control (C).

Control de calidad

Un control interno está incluido en cada tira (LF). Una línea de color aparece en la región control (C), este es el control interno del procedimiento, su función es confirmar que hubo suficiente cantidad de muestra y el procedimiento fue correcto. Esta prueba incluye controles, por lo que, se recomienda emplearlos en cada análisis de muestra como buena práctica de laboratorio.

Limitaciones

- Los resultados deben ser interpretados por personal calificado.
- La prueba FetalAMP es solo para uso profesional *in vitro*. Esta prueba cualitativa no puede determinar el valor cuantitativo ni la tasa de aumento en la concentración del gen SRY.
- La prueba FetalAMP solo proporciona un resultado positivo o negativo a la presencia del gen SRY, por lo que un resultado positivo no necesariamente indica el sexo del bebé más actual, el desempeño de la prueba dependerá del historial de embarazos de la paciente.
- Esta prueba únicamente detecta el gen SRY y solo debe ser usada para dicho fin.
- La tonalidad que adquiera la membrana no interfiere en el resultado, mientras la línea de color en la región control (C) se visualice el resultado es válido.
- Los resultados negativos no descartan un positivo ya que la mayor sensibilidad esperada es a partir de las 12 semanas de embarazo.
- Se han reportado casos en los que el gen SRY puede estar presente de forma indefinida por un embarazo anterior, por lo que, existe una probabilidad de detectar el gen SRY de un bebé con sexo masculino anterior y no del actual [7].
- El desempeño de la prueba se ha evaluado bajo las condiciones y características mencionadas en este manual. Se recomienda seguir las instrucciones para asegurar la precisión de los resultados.

Características de presentación

Precisión

Intra-ensayo

La repetibilidad de la prueba se determinó realizando 20 réplicas con diferentes concentraciones del gen SRY incluyendo uno libre de éste, se utilizó reactivo diluyente como muestra. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Inter-ensayo

La reproducibilidad de la prueba se determinó realizando 20 réplicas de 3 lotes diferentes de la prueba en dos días diferentes por cada concentración incluyendo una libre del gen SRY, se utilizó reactivo diluyente como muestra. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Sustancias interferentes

La prueba FetalAMP fue evaluada con diferentes sustancias a las concentraciones indicadas en la siguiente tabla, se realizaron 10 réplicas por cada sustancia utilizando cada tipo de muestra. Ninguna presentó interferencia.

- Acetaminofén (20 mg/dL)
- Cafeína (20 mg/dL)
- Hemoglobina (1000 mg/dL)
- Bilirrubina (1000 mg/dL)
- Ácido acetilsalicílico (20 mg/dL)
- Albumina 10,500 (10,500 mg/dL)
- Colesterol (800 mg/dL)
- Ácido ascórbico (20 mg/dL)
- Ácido oxálico (600 mg/dL)
- Creatina (200 mg/dL)
- Triglicéridos (1,600 mg/dL)
- Ácido gálico (20 mg/dL)
- Urea (103 mg/dL)

Desempeño

La prueba FetalAMP se ha probado con 72 muestras obtenidas de mujeres embarazadas con una edad gestacional entre 8 y 42 semanas sin antecedentes de embarazos/abortos en los últimos 3 años. Los resultados de la prueba fueron comparados con el sexo fenotípico del recién nacido.

Prueba FetalAMP	Método		Muestras caracterizadas		Resultados totales
	Resultado	Positivo	Negativo		
	Positivo	37	2	39	
Negativo	1	32	33		
Resultados totales		38	34	72	

Sensibilidad Relativa: 97.37% (95% IC: 90.64% - 99.3%)
Especificidad Relativa: 94.12% (95% IC: 86.14% - 100.00%)
Precisión Global: 95.83% (95% IC: 88.45% - 100.00%)
IC: Intervalo de confianza

Consideraciones adicionales

- Asegúrese de utilizar la cantidad indicada de muestra para la prueba, ya que demasiada o muy poca muestra puede conducir a una desviación de los resultados.
- Es necesaria la purificación de ADN circulante fetal previo al análisis para obtener mejores resultados.
- El pretratamiento de la muestra es sensible al tiempo y temperatura. Para evitar resultados incorrectos, se recomienda seguir tal cual los pasos enunciados en el presente documento.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes ni use reactivos de otras pruebas disponibles comercialmente. Los componentes de esta prueba se combinan con precisión para un rendimiento óptimo.
- Las micropipetas y consumibles deben ser estériles. Se recomienda irradiar con luz UV por 15 minutos antes de su uso, las micropipetas previamente limpiadas con cloro y etanol asegúrese de no dejar residuos.

- Se recomienda el uso de equipo de protección al trabajar muestras.
- PRECAUCIÓN:** Permita que los reactivos y las muestras se descongelen completamente antes de su uso. Mezcle el reactivo suavemente antes de usar teniendo la precaución de no generar espuma. Regrese a su temperatura de almacenamiento después de su uso.
- PRECAUCIÓN:** No deje abierto el contenedor de las pruebas FetalAMP, solo ábrala hasta su uso, la presencia de humedad puede afectar el desempeño de la prueba.
- Evite interrupciones prolongadas de los pasos del ensayo. Asegure las mismas condiciones de trabajo para todos los tubos.
- Calibre las micropipetas con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Use puntas diferentes de micropipeta en cada muestra y reactivo para evitar contaminación cruzada.
- La prueba podría verse afectada por el polvo, reactivos químicos y/o sustancias como hipoclorito de sodio, ácidos, álcalis, etanol, etc. No realice el ensayo en presencia de estas sustancias y utilice puntas nuevas de preferencia con filtro.
- Todas las muestras de origen humano deben considerarse potencialmente infecciosas. El cumplimiento estricto de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) puede garantizar la seguridad del personal.
- Todos los productos de desecho generados por esta prueba deben disponerse de acuerdo a la NOM-087 vigente sobre el manejo de Residuos Biológico infecciosos.

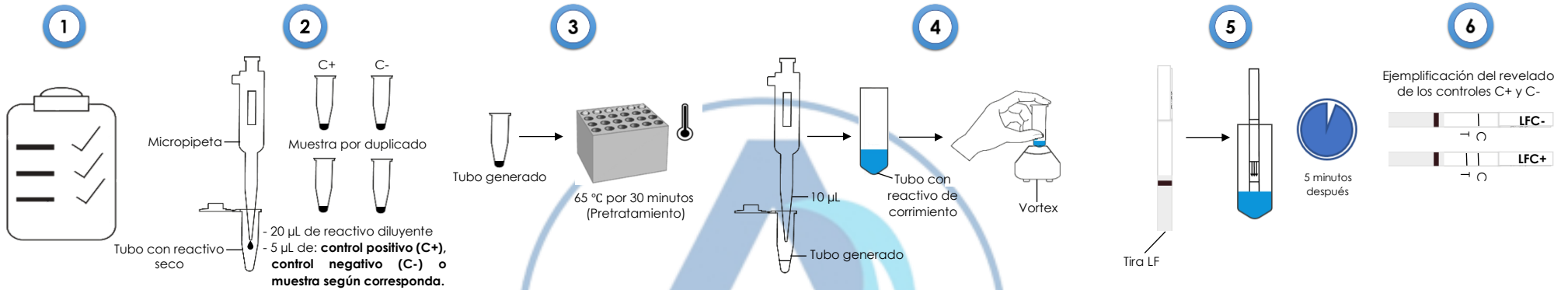
Referencias

- Cruz-Coke R. Fundamentos genéticos del comienzo de la vida humana. Chile.
- Díaz-Hernández, V., & Merchant-Larios, H. (2017). Consideraciones generales en el establecimiento del sexo en mamíferos. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 20(1), 27-39.
- Hanley, N. A., Hagan, D. M., Clement-Jones, M., Ball, S. G., Strachan, T., Salas-Cortes, L., ... & Wilson, D. I. (2000). SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mechanisms of development*, 91(1-2), 403-407.
- Monfaredan, A., Amiri, S., Tabatabaei, S. (2017). Sex determination using free fetal DNA in early pregnancy: With the approach to sex linked recessive disorders.
- Carvajal C, Jorge, & Vera P-G, Claudio. (2010). Confiabilidad de la determinación del sexo fetal usando plasma materno (1). *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 75(1), 77-79. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75262010000100012>
- Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouvannic JM, Ernaul P, Dumez Y. First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenat Diagn*. 2001 Dec;21(12):1070-4. doi: 10.1002/pd.219. Erratum in: *Prenat Diagn*. 2002 Dec;22(13):1242. PMID: 11746166.
- Invernizzi, P., Biondi, M. L., Battezzati, P. M., Perego, F., Selmi, C. C., Podda, M. & Simoni, G. (2002). Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Hum Genet*.

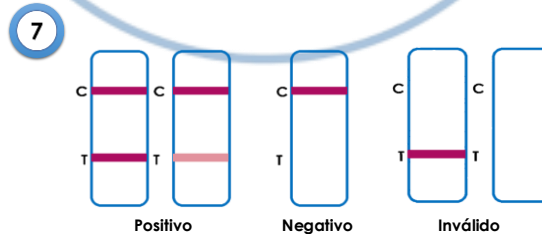
Índice de símbolos

	Consultar el instructivo de uso		Caducidad
	Solo para evaluación de desempeño <i>in vitro</i>		Número de catálogo
	Almacenar entre 2 - 30 °C		Número de lote
	No utilizar si el paquete está dañado		No reutilizar

Esquema de instrucciones de uso



- Tome cada tubo generado (C+, C- y muestra) y colóquelos en cualquiera de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador.
- Programe el equipo para que alcance una temperatura de 65 °C y déjelos por 30 minutos.
- Tome uno de los tubos generados (C+, C- o muestra) y con ayuda de una micropipeta recolecte 10 µL después transfíralos a un tubo con reactivo de corrimiento y rotule.
- Mezcle por medio de pipeteo o 5 segundos en vortex.
- Repita este paso para cada uno de los tubos generados restantes.
- Una vez hayan pasado 5 minutos saque la prueba del tubo, colóquela sobre una superficie plana y limpia



- Interprete los resultados conforme a la imagen superior.
- Nota: No interprete los resultados después de 5 minutos.