



ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit

REF Z-2099-20

20

Para hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) con cualquier sonda ZytoLight FISH



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*
conforme a la Directiva europea 98/79/CE

1. Uso previsto

El kit ZytoLight FISH-Cytology Implementation está diseñado para su uso en combinación con sondas ZytoLight FISH para la detección de anomalías genéticas, por ejemplo, translocaciones, deleciones, amplificaciones y aneuploidías cromosómicas, mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).

Los resultados deben ser interpretados por un anatomopatólogo cualificado en el contexto de la historia clínica del paciente y junto con otros datos clínicos y anatomopatológicos.

2. Relevancia clínica

Las anomalías genéticas, por ejemplo, translocaciones, deleciones o amplificaciones, se asocian a varias neoplasias humanas. Las aneuploidías cromosómicas se observan en muchos trastornos congénitos.

3. Principio del ensayo

La técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) permite la detección y visualización de secuencias específicas de ácidos nucleicos en las preparaciones celulares. Los fragmentos de ADN marcados con fluorescencia, llamados *sondas FISH*, se desnaturalizan simultáneamente con sus cadenas diana de ADN complementario en las preparaciones y, posteriormente, se deja que se reasocien durante la hibridación. A continuación, los fragmentos inespecíficos y no unidos de la sonda se eliminan mediante pasos de lavado riguroso. Después de la contratinción del ADN con DAPI, los fragmentos de sonda hibridados se visualizan en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros de excitación y emisión específicos para los fluorocromos con los que se han marcado directamente los fragmentos de sonda FISH.

4. Reactivos suministrados

El kit ZytoLight FISH-Cytology Implementation se compone de:

Code	Componente	Cantidad	Recipiente
		Σ 20	
ES2	<u>Cytology Pepsin Solution</u>	4 ml	Frasco cuentagotas, tapón transparente
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	50 ml	Frasco con tapón de rosca
PT4	<u>10x MgCl₂</u>	50 ml	Frasco con tapón de rosca
PT5	<u>10x PBS</u>	50 ml	Frasco con tapón de rosca
WB7	<u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Frasco con tapón de rosca (grande)
WB8	<u>Cytology Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Frasco con tapón de rosca (grande)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0,8 ml	Recipiente de reacción, tapa azul
	Instrucciones de uso	1	

Z-2099-20 (20 pruebas): Los componentes **ES2** y **MT7** se suministran con una cantidad suficiente para 20 reacciones. Los componentes **PT4**, **PT5**, **WB7** y **WB8** son suficiente para 7 cubetas de tinción de 70 ml cada una. El componente **WB5** es suficiente para 14 cubetas de tinción de 70 ml cada una.

5. Material necesario no suministrado

- ZytoLight FISH probe
- Muestras de control positivas y negativas
- Portaobjetos para microscopio, no recubiertos
- Baño María (70 °C)
- Hibridador o placa térmica
- Hibridador o cámara húmeda en horno de hibridación
- Pipetas ajustables (10 μ l, 25 μ l)
- Cubetas o baños de tinción
- Cronómetro
- Termómetro calibrado
- Alcohol reactivo o etanol
- Formaldehído sin ácidos al 37 % o formol tamponado neutro al 10 %
- 2 x citrato de sodio salino (SSC), p. ej., 20x SSC Solution (Ref. WB-0003-50)
- Agua desionizada o destilada
- Cubreobjetos (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Adhesivo de caucho, p. ej., Fixogum Rubber Cement (Ref. E-4005-50/-125) o similar
- Microscopio de fluorescencia debidamente mantenido (400-1000x)
- Aceite de inmersión aprobado para microscopía de fluorescencia
- Juego de filtros adecuado

6. Almacenamiento y manipulación

Los componentes del kit se deben almacenar a una temperatura de 2-8 °C. Además, la solución DAPI/DuraTect-Solution (**MT7**) se debe almacenar protegida de la luz. Volver a guardar los componentes de inmediato en las condiciones indicadas tras su uso. Si se cumplen estas condiciones, el kit funcionará, sin pérdida de rendimiento, al menos hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

7. Advertencias y precauciones

- Leer las instrucciones del producto antes del uso.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- Este producto contiene sustancias (en concentraciones y volúmenes bajos) que son perjudiciales para la salud y potencialmente infecciosas. Evitar cualquier contacto directo con los reactivos. Tomar las medidas de protección adecuadas (utilizar guantes desechables, gafas de protección e indumentaria de laboratorio).

- Si los reactivos entran en contacto con la piel, lavar inmediatamente con agua abundante.
- La ficha de datos de seguridad para el usuario profesional está disponible previa solicitud.
- No reutilizar los reactivos.
- No se debe permitir que las muestras se sequen durante los pasos de hibridación y lavado.
- La solución DAPI/DuraTect-Solution (MT7) no debe exponerse a la luz, especialmente la luz intensa, durante un período de tiempo prolongado, es decir, se deben realizar todos los pasos, en la medida de lo posible, en la oscuridad o empleando recipientes opacos.

Indicaciones de peligro y consejos de prudencia para PT4, PT5, WB5, WB7 y WB8:

El componente que determina el peligro es una mezcla de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [N.º CE 247-500-7] y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [N.º CE 220-239-6] (3:1).



Atención

H317	Puede provocar una reacción cutánea alérgica.
P261	Evitar respirar polvos/humos/gases/nieblas/vapores/aerosoles.
P272	La ropa de trabajo contaminada no debe salir del lugar de trabajo.
P280	Usar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.
P333+P313	En caso de irritación cutánea o sarpullido: consultar a un médico.
P362+P364	Quitar la ropa contaminada y lavarla antes de volverla a usar.

8. Limitaciones

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Solo para uso profesional.
- La interpretación clínica de cualquier tinción positiva, o su ausencia, debe realizarse en el contexto de la historia clínica, la morfología, otros criterios histopatológicos, así como otras pruebas diagnósticas. Es responsabilidad de un anatomopatólogo cualificado familiarizarse con las sondas FISH, los reactivos, los grupos de pruebas diagnósticas y los métodos utilizados para obtener la preparación teñida. La tinción se debe llevar a cabo en un laboratorio certificado y autorizado, bajo la supervisión de un anatomopatólogo que sea responsable de examinar los portaobjetos teñidos y de garantizar la idoneidad de los controles positivos y negativos.
- La tinción de muestras, en particular la intensidad de la señal y la tinción de fondo, depende de la manipulación y el procesamiento de la muestra antes de la tinción. La fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o corte inadecuados, o la contaminación con otras muestras o líquidos, pueden producir artefactos o resultados falsos. Los resultados incoherentes pueden deberse a variaciones en los métodos de fijación e inclusión, así como a irregularidades inherentes a la propia muestra.
- El rendimiento se validó utilizando los procedimientos descritos en estas instrucciones de uso. Cualquier modificación de estos procedimientos podría variar el rendimiento, por lo que debe validarla el usuario.

9. Sustancias interferentes

Los eritrocitos presentes en la muestra podrían presentar autofluorescencia, lo que dificulta el reconocimiento de señales.

10. Preparación de muestras

Incubar los portaobjetos durante 2 minutos en una solución SSC 2x a 73 °C inmediatamente antes de la proteólisis para el envejecimiento.

Como alternativa, el envejecimiento de las muestras se puede lograr mediante la incubación de las muestras durante la noche (12 a 16 h) a 37 °C.

11. Preparación previa del producto

20x Wash Buffer TBS (WB5), 10x MgCl₂ (PT4) y 10x PBS (PT5) se deben tratar previamente de acuerdo con las instrucciones del punto 12. "Procedimiento de ensayo". Los demás reactivos del kit están listos para usar; no precisan reconstitución, mezcla ni dilución.

12. Procedimiento de ensayo

12.1 Día 1

Pasos preparatorios

- *Preparación de 1x Wash Buffer TBS:* Diluir 1 parte de 20x Wash Buffer TBS (WB5) con 19 partes de agua desionizada o destilada.
- *Preparación de solución de formaldehído al 1 %:* Para 100 ml de solución de formaldehído al 1 %, mezclar 2,7 ml de formaldehído sin ácidos al 37 % o 25 ml de formol tamponado neutro (formaldehído al 4 %) con 10 ml de 10x MgCl₂ (PT4) y 10 ml de 10x PBS (PT5), y ajustar el volumen hasta 100 ml con agua desionizada o destilada. Mezclar bien.
- *Preparación de una serie de etanol (soluciones de etanol al 70 %, el 90 % y el 100 %):* Diluir 7, 9 y 10 partes de etanol al 100 % con 3, 1 y 0 partes de agua desionizada o destilada, respectivamente. Estas soluciones se pueden conservar en recipientes adecuados y pueden reutilizarse.

Pretratamiento (proteólisis/post-fijación)

- (1) Aplicar (gota a gota) Cytology Pepsin Solution (ES2) a la muestra citológica e incubar durante 10 minutos a 37 °C en una cámara húmeda.

Dependiendo de múltiples factores, p. ej., la naturaleza y la duración de la fijación, así como la naturaleza de las células, se pueden necesitar diferentes tiempos de incubación. Se recomienda un tiempo de incubación de 5 a 15 minutos para las muestras citológicas. Como norma general, recomendamos determinar el momento óptimo para la proteólisis en las pruebas previas.

- (2) Incubar los portaobjetos durante 5 minutos en 1x Wash Buffer TBS.
- (3) Incubar los portaobjetos durante 5 minutos en una solución de formaldehído al 1 %:
- (4) Incubar los portaobjetos durante 5 minutos en 1x Wash Buffer TBS.
- (5) Deshidratación: etanol al 70 %, 90 % y 100 %, cada uno durante 1 minuto.

Dejar secar las muestras.

Desnaturalización e hibridación

1. Pipetear 10 µl de la sonda en cada muestra pretratada.
2. Cubrir las muestras con un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm (evitando que queden burbujas) y sellarlo.

Se recomienda utilizar adhesivo de caucho (p. ej., Fixogum) para el sellado.

3. Colocar los portaobjetos en una placa térmica o un hibridador y desnaturalizar las muestras durante 5 minutos a 72 °C.
4. Transferir los portaobjetos a una cámara húmeda y dejar hibridar toda la noche a 37 °C (p. ej., en un horno de hibridación).

Es imprescindible que las muestras no se sequen durante la etapa de hibridación.

12.2 Día 2

Pasos preparatorios

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7): Precalentar a 70 °C.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8): Dejar que alcance la temperatura ambiente.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Dejar que alcance la temperatura ambiente antes de usar, proteger de la luz.

Post-hibridación y detección

- (1) Retirar con cuidado el pegamento o el adhesivo de caucho.
- (2) Retirar con cuidado el cubreobjetos.
- (3) Lavar con Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) durante 2 minutos a 70 °C.

El tampón Cytology Stringency Wash Buffer SSC se debe precalentar. Comprobar con un termómetro si es necesario.

Se recomienda utilizar cuatro portaobjetos por cubeta de tinción. Cuando sea necesario, utilizar portaobjetos vacíos para ajustar el número a cuatro.

- (4) Lavar con Cytology Wash Buffer SSC (WB8) durante 1 minuto a temperatura ambiente.

El tampón Cytology Wash Buffer SSC se debe precalentar a temperatura ambiente. Comprobar con un termómetro si es necesario.

- (5) Dejar secar las muestras protegidas de la luz.
- (6) Pipetear 25 µl de DAPI/DuraTect-Solution(MT7) sobre los portaobjetos. Evitando que queden burbujas, cubrir las muestras con un cubreobjetos (24 mm x 60 mm). Incubar en la oscuridad durante 15 minutos.

El uso de una punta de pipeta que se ha cortado para aumentar el tamaño de la abertura, puede facilitar el proceso de pipeteo. Evitar la exposición prolongada a la luz.

- (7) Guardar el portaobjetos en la oscuridad. Para períodos de almacenamiento más prolongados, almacenar entre 2 y 8 °C.
- (8) La evaluación del material de muestra se realiza mediante microscopía de fluorescencia. Se requieren juegos de filtros para los siguientes intervalos de longitud de onda:

Tinte fluorescente	Excitación	Emisión
ZyBlue	418 nm	467 nm
ZyGreen	503 nm	528 nm
ZyGold	532 nm	553 nm
ZyOrange	547 nm	572 nm
ZyRed	580 nm	599 nm

13. Interpretación de los resultados

Con el uso de juegos de filtros adecuados en interfases o metafases de células normales o células sin anomalías de cromosomas, aparecen dos señales por sonda/marcador de fluorescencia, excepto para las sondas que se dirigen a los cromosomas X o Y, lo que produce entre ninguna o dos señales por sonda/marcador de fluorescencia, según el sexo. En células con anomalías cromosómicas, se puede observar un patrón de señal diferente en interfases o metafases. Para obtener más detalles sobre la interpretación de los resultados, consultar el manual de la sonda correspondiente.

14. Procedimientos de control de calidad recomendados

Para controlar el correcto rendimiento de las muestras procesadas y los reactivos analíticos, cada ensayo debe ir acompañado de controles internos y externos. Si los controles internos o externos no revelan una tinción adecuada, los resultados de las muestras del paciente deben considerarse no válidos.

Control interno: Células no neoplásicas en la muestra que presentan un patrón de señal normal.

Control externo: Muestras de control positivas y negativas validadas.

15. Características de rendimiento

Consultar las instrucciones de uso de la sonda correspondiente.

16. Eliminación

La eliminación de los reactivos debe llevarse a cabo de acuerdo con las normativas locales.

17. Resolución de problemas

Cualquier desviación de las instrucciones de uso puede producir resultados de tinción inferiores o ausencia de tinción.

Señales débiles o ausencia de señales

Posible causa	Medida
No hay secuencias objetivo disponibles	Uso de los controles apropiados
Proteólisis, desnaturalización, hibridación o temperatura de lavado riguroso incorrecta	Comprobar la temperatura de todos los aparatos técnicos utilizados mediante un termómetro calibrado
Pretratamiento proteolítico no realizado correctamente	Optimizar el tiempo de incubación con pepsina, aumentar o disminuir si es necesario
Evaporación de la sonda	Cuando se utiliza un hibridador, es obligatorio el uso de bandas húmedas/tanques llenos de agua. Cuando se utiliza un horno de hibridación, se requiere el uso de una cámara húmeda. Además, el cubreobjetos se debe sellar completamente, por ejemplo, con Fixogum, para evitar que la muestra se seque durante la hibridación.
Tampón de lavado riguroso con una concentración demasiado baja	Comprobar la concentración de tampón de lavado riguroso
Soluciones de deshidratación antiguas	Preparar soluciones de deshidratación recientes
Microscopio de fluorescencia mal ajustado	Ajustar correctamente
Se han utilizado juegos de filtros inadecuados	Utilizar juegos de filtros adecuados para los fluorocromos de la sonda. <i>Los juegos de filtros de paso de banda triple proporcionan menos luz en comparación con los juegos de filtros de paso de banda simple o doble. Por consiguiente, las señales pueden ser más débiles con estos juegos de filtros de paso de banda triple.</i>
Fotodaño de las sondas/fluoróforos	Realizar los pasos de hibridación y lavado en la oscuridad

Señales de hibridación cruzada; ruido de fondo

Posible causa	Medida
Tratamiento proteolítico previo demasiado intenso	Reducir el tiempo de incubación con pepsina
Volumen de sonda por área demasiado alto	Reducir el volumen de sonda por muestra/área; distribuir la sonda gota a gota para evitar la concentración local
Los portaobjetos se enfriaron a temperatura ambiente antes de la hibridación	Transferir los portaobjetos rápidamente a 37 °C

Tampón de lavado riguroso con una concentración demasiado alta	Comprobar la concentración de tampón de lavado riguroso
Temperatura de lavado después de la hibridación demasiado baja	Comprobar la temperatura; aumentar si es necesario
Deshidratación de las muestras entre los distintos pasos de incubación	Sellar los portaobjetos y realizar la incubación en un ambiente húmedo para evitar la deshidratación

Morfología degradada

Posible causa	Medida
Pretratamiento proteolítico no realizado correctamente	Optimizar el tiempo de incubación con pepsina, aumentar o disminuir si es necesario
Secado insuficiente antes de la aplicación de la sonda	Prolongar el secado al aire

Contratinción débil

Posible causa	Medida
Solución DAPI de concentración baja	Utilizar <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Ref. MT-0008-0.8) en su lugar
Tiempo de incubación de DAPI demasiado corto	Ajustar el tiempo de incubación de DAPI

18. Bibliografía

- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Nuestros expertos están a su disposición para resolver cualquier duda. Póngase en contacto con helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
 Fischkai 1
 27572 Bremerhaven/Alemania
 Teléfono: +49 471 4832-300
 Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
 Correo electrónico: info@zytovision.com

Marcas comerciales:

ZytoVision® y ZytoLight® son marcas comerciales de ZytoVision GmbH.