



## F/exlSH- Tissue Implementation Kit

**REF** Z-2182-5 Σ 5

**REF** Z-2182-20 Σ 20

Para hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) con cualquier sonda F/exlSH



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

### 1. Uso previsto

El kit FlexISH-Tissue Implementation Kit está diseñado para su uso en combinación con sondas F/exlSH para la detección de anomalías genéticas, por ejemplo, translocaciones, deleciones, amplificaciones y aneuploidías cromosómicas, en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina 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.

### 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 F/exlSH-Tissue Implementation Kit se compone de:

| Código | Componente                               | Cantidad |        | Recipiente                         |
|--------|--|----------|--------|------------------------------------|
|        |  | 20       | 5      |                                    |
| PT1    | <u>Heat Pretreatment Solution Citric</u> | 500 ml   | 150 ml | Frasco con tapón de rosca (grande) |
| ES1    | <u>Pepsin Solution</u>                   | 4 ml     | 1 ml   | Frasco cuentagotas, tapón blanco   |
| WB10   | <u>5x F/exlSH Wash Buffer</u>            | 500 ml   | 150 ml | Frasco con tapón de rosca (grande) |
| MT7    | <u>DAPI/DuraTect-Solution</u>            | 0,8 ml   | 0,2 ml | Recipiente de reacción, tapa azul  |
|        | Instrucciones de uso                     | 1        | 1      |                                    |

**Z-2182-20 (20 pruebas):** Los componentes **ES1** y **MT7** se suministran con una cantidad suficiente para 20 reacciones. El componente **WB10** es suficiente para 11x3 cubetas de tinción de 70 ml cada una. El componente **PT1** es suficiente para 7 cubetas de tinción de 70 ml cada una.

**Z-2182-5 (5 pruebas):** Los componentes **ES1** y **MT7** se suministran con una cantidad suficiente para 5 reacciones. El componente **WB10** es suficiente para 3x3 cubetas de tinción de 70 ml cada una. El componente **PT1** es suficiente para 2 cubetas de tinción de 70 ml cada una.

### 5. Material necesario no suministrado

- F/exlSH probe
- Muestras de control positivas y negativas
- Portaobjetos para microscopio, con carga positiva
- Baño María (37 °C, 98 °C)
- Hibridador o placa térmica
- Hibridador o cámara húmeda en horno de hibridación
- Pipetas ajustables (10 µl, 25 µl)
- Cubetas o baños de tinción
- Cronómetro
- Termómetro calibrado
- Alcohol reactivo o etanol
- Xileno
- 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.
- Evitar la contaminación cruzada de las muestras, ya que esto puede generar resultados erróneos.
- 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 PT1 y WB10:

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.

Los siguientes fijadores son incompatibles con ISH:

- Fijador de Bouin
- Fijador B5
- Fijadores de ácidos (p. ej., ácido pícrico)
- Fijador de Zenker
- Alcoholes (cuando se usan solos)
- Cloruro de mercurio
- Fijador de formaldehído/zinc
- Fijador de Hollande
- Formol no tamponado

#### 10. Preparación de muestras

Recomendaciones:

- Fijación en formol tamponado neutro al 10 % durante 24 horas a temperatura ambiente (18-25 °C).
- Tamaño de muestra  $\leq 0,5 \text{ cm}^3$ .
- Utilizar parafina de calidad superior.
- La inclusión se debe realizar a temperaturas inferiores a 65 °C.
- Preparar cortes de micrótopo de 2-4  $\mu\text{m}$ .
- Utilizar portaobjetos de microscopio cargados positivamente.
- Fijar durante 2-16 h a 50-60 °C.

#### 11. Preparación previa del producto

El tampón 5x FlexISH Wash Buffer (WB10) se debe 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

- (1) Preparación de dos series de etanol (soluciones de etanol al 70 %, 90 % y 100 %): Diluir etanol al 100 % con agua desionizada o destilada. Estas soluciones se pueden conservar en recipientes adecuados y pueden reutilizarse hasta para 160 portaobjetos.
- (2) Heat Pretreatment Solution Citric (PT1): Llenar una cubeta de tinción y calentar a 98 °C.
- (3) Sonda FlexISH Probe: Dejar que alcance la temperatura ambiente antes de usar, proteger de la luz. Antes de abrir el frasco, mezclar en agitadora vortical y centrifugar brevemente.

##### Tratamiento previo (desparafinación/proteólisis)

- (1) Incubar los portaobjetos 2 veces durante 5 minutos en xileno.
- (2) Incubar en etanol al 100 %, 90 % y 70 %, cada uno durante 2 min.
- (3) Lavar 2 veces durante 2 minutos en agua desionizada o destilada.
- (4) Incubar durante 20 minutos en Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) precalentada a 98 °C.

*Se recomienda no utilizar más de ocho portaobjetos por cubeta de tinción. Después de sumergir los portaobjetos, comprobar la temperatura de la solución Heat Pretreatment Solution Citric en la cubeta e iniciar el tiempo tan pronto como la temperatura de la solución alcance como mínimo los 95 °C.*

- (5) Transferir los portaobjetos inmediatamente a agua desionizada o destilada, lavar 2 veces durante 2 minutos y drenar o dejar secar el agua.
- (6) Aplicar (gota a gota) Pepsin Solution (ES1) a las muestras e incubar durante 15 minutos a 37 °C en una cámara húmeda.

*Dependiendo de múltiples factores, p. ej., la naturaleza y la duración de la fijación, el grosor de los cortes y la naturaleza de las muestras, pueden ser necesarios diferentes tiempos de incubación. Como directriz de incubación, recomendamos un tiempo de incubación de entre 2 min y 30 min. Como norma general, recomendamos determinar el momento óptimo para la proteólisis en las pruebas previas.*

- (7) Lavar 2 veces durante 2 minutos en agua desionizada o destilada.
- (8) Deshidratación: etanol al 70 %, 90 % y 100 %, cada uno durante 1 minuto.
- (9) Dejar secar los cortes al aire.

*Asegurarse de secar completamente los cortes antes de aplicar la sonda, ya que la humedad residual puede reducir la intensidad de la señal o afectar a la morfología de la muestra.*

##### Desnaturalización e hibridación

- (1) Pipetear 10  $\mu\text{l}$  de la sonda FlexISH Probe en cada muestra pretratada.

*Evitar la exposición prolongada de la sonda a la luz.*

- (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 10 minutos a 75 °C.
- (4) Realizar la hibridación durante un periodo de entre 2 h y 16 h (es decir, durante la noche) a 37 °C, ya sea transfiriendo los portaobjetos a un hibridador o a una cámara húmeda y un horno de hibridación.

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

## 12.2 Día 1 o Día 2

### Pasos preparatorios

- (1) Preparación del tampón 1x F/lexSH Wash Buffer: Diluir 1 parte del tampón 5x F/lexSH Wash Buffer (WB10) con 4 partes de agua desionizada o destilada. Llenar tres cubetas de tinción con el tampón 1x F/lexSH Wash Buffer, precalentar una cubeta a 72 °C y conservar dos cubetas a temperatura ambiente.
- (2) 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 los cubreobjetos sumergiéndolos en el tampón 1x F/lexSH Wash Buffer a temperatura ambiente durante 1-2 minutos.

Para facilitar la retirada del cubreobjetos, este paso se puede realizar de forma alternativa durante 2 minutos a 37 °C.

- (3) Lavar con el tampón 1x F/lexSH Wash Buffer durante 10 minutos a 72 °C.

El tampón 1x FlexISH Wash Buffer se debe precalentar. Comprobar con un termómetro si es necesario. No utilizar más de 8 portaobjetos por cubeta de tinción.

- (4) Lavar con el tampón 1x F/lexSH Wash Buffer durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- (5) Incubar los portaobjetos en etanol al 70 %, 90 % y 100 %, cada uno durante 1 minuto.
- (6) Dejar secar las muestras al aire protegidas de la luz.
- (7) Pipetear 25 µl de DAPI/DuraTect-Solution (MT7) sobre los portaobjetos. Cubrir las muestras con un cubreobjetos (24 mm x 60 mm), evitando que queden burbujas. Incubar en la oscuridad durante 15 minutos.

El uso de una punta de pipeta cortada para aumentar el tamaño de la abertura puede facilitar el proceso de pipeteo. Evitar la exposición prolongada a la luz.

- (8) Guardar los portaobjetos en la oscuridad. Para períodos de almacenamiento más prolongados, almacenar entre 2 °C y 8 °C.
- (9) 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 dirigidas 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, por ejemplo, los fibroblastos.

**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   |
| Muestra celular o tisular no fijada correctamente   | Optimizar el tiempo de fijación y el fijador  |
| Pretratamiento con calor, 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.        |
| Concentración del tampón F/lexSH Wash Buffer demasiado baja   | Comprobar la concentración del tampón F/lexSH Wash Buffer   |
| 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  |

**Morfología tisular degradada**

| Posible causa  | Medida  |
|--|---|
| La muestra celular o tisular no se ha fijado correctamente | Optimizar el tiempo de fijación y el fijador  |
| Pretratamiento proteolítico no realizado correctamente     | Optimizar el tiempo de incubación con pepsina |
| Secado insuficiente antes de la aplicación de la sonda     | Prolongar el secado al aire                   |

**Señales de hibridación cruzada; ruido de fondo**

| Posible causa  | Medida   |
|--|--|
| Desparafinación incompleta   | Utilizar soluciones recién preparadas; comprobar la duración de la desparafinación                             |
| 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 corte/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  |
| Concentración del tampón riguroso F/exSH Wash Buffer demasiado alta          | Comprobar la concentración del tampón F/exSH Wash Buffer   |
| 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           |

**Núcleos superpuestos**

| Posible causa                                | Medida  |
|--|---|
| Grosor inadecuado de los cortes histológicos | Preparar cortes de micrótopo de 2-4 $\mu\text{m}$ |

**La muestra se desliza fuera del portaobjetos**

| Posible causa                                     | Medida                                      |
|---|---|
| Recubrimiento poco apropiado del portaobjetos     | Utilizar portaobjetos adecuados             |
| Tratamiento proteolítico previo demasiado intenso | Reducir el tiempo de incubación con pepsina |

**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](mailto:helptech@zytovision.com)



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

**Marcas comerciales:**

ZytoVision® y F/exSH® son marcas comerciales de ZytoVision GmbH.