



ZytoLight

Bladder Cancer Quadruple Color Probe

REF Z-2305-50  5 (0,05 ml)

REF Z-2305-200  20 (0,2 ml)

Para la detección cualitativa del gen CDKN2A humano y satélites alfa de los cromosomas 3, 7 y 17 mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)



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

1. Uso previsto

La sonda ZytoLight Bladder Cancer Quadruple Color Probe (PL259) está diseñada para la detección cualitativa del gen CDKN2A humano y satélites alfa de los cromosomas 3, 7 y 17 en muestras citológicas como muestras de orina mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). La sonda está prevista para su uso en combinación con ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Ref. Z-2099-20).

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

El cáncer de vejiga (CV) representa el noveno cáncer más frecuente en todo el mundo. En 2012 se produjeron unos 430 000 casos nuevos de CV y 165 000 muertes por CV. La mayoría de estos tumores son tumores papilares no invasivos y bien diferenciados (pTa, de bajo grado) que pueden curarse mediante resección transuretral endoscópica. Sin embargo, hasta el 70 % de los tumores pTa y superficialmente invasivos (pT1) reaparecen, de los cuales el 15-30 % se caracterizan por progresión del tumor. Por lo tanto, es necesario un seguimiento a largo plazo de los pacientes con CV. Los dos métodos habituales utilizados en el seguimiento son invasivos (cistoscopia) o tienen baja sensibilidad (citología). Las células de CV se caracterizan por cambios citogenéticos típicos. La delección homocigota del gen CDKN2A en 9p21.3 y la polisomía de los cromosomas 3, 7 y/o 17 son anomalías frecuentes observadas en el carcinoma de células uroteliales, y todas pueden detectarse mediante FISH. Se ha demostrado que la FISH en las células de orina es muy sensible y específica para la detección de células tumorales en la orina.

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

La sonda ZytoLight Bladder Cancer Quadruple Color Probe se compone de:

- Polinucleótidos marcados en dorado (excitación a 532 nm y emisión a 553 nm) ZyGold (~5,5 ng/μl), dirigidos a secuencias localizadas en 9p21.3* (chr9:21,742,619-22,056,863) que albergan la región del gen CDKN2A (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos marcados en rojo (excitación a 580 nm y emisión a 599 nm) ZyRed (~0,5 ng/μl), dirigidos a secuencias localizadas 3p11.1-q11.1 específicas para la región centromérica satélite alfa D3Z1 del cromosoma 3.
- Polinucleótidos marcados en verde (excitación a 503 nm/emisión a 528 nm) ZyGreen (~4,5 ng/μl), dirigidos a secuencias localizadas 7p11.1-q11.1 específicas para la región centromérica satélite alfa D7Z1 del cromosoma 7.
- Polinucleótidos marcados en azul (excitación a 418 nm y emisión a 467 nm) ZyBlue (~12 ng/μl), dirigidos a secuencias localizadas 17p11.1-q11.1 específicas para la región centromérica satélite alfa D17Z1 del cromosoma 17.

- Tampón de hibridación basado en formamida

*de acuerdo con el ensamblaje del genoma humano GRCh37/hg19

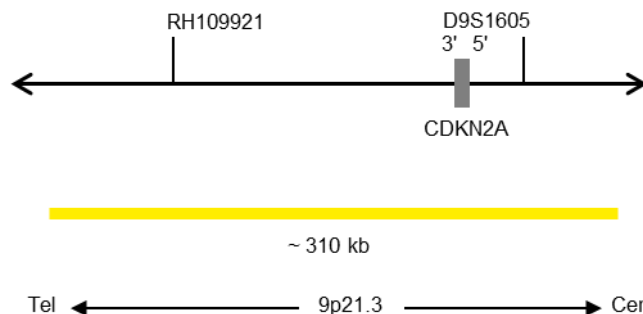


Fig. 1: SPEC CDKN2A Mapa de la sonda (no está a escala)

La sonda ZytoLight Bladder Cancer Quadruple Color Probe está disponible en dos tamaños:

- Z-2305-50: 0,05 ml (5 reacciones de 10 μl cada una)
- Z-2305-200: 0,2 ml (20 reacciones de 10 μl cada una)

5. Material necesario no suministrado

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Ref. Z-2099-20)
- 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 μl, 25 μl)
- 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 microscopia de fluorescencia
- Juego de filtros adecuado

6. Almacenamiento y manipulación

Almacenar a una temperatura de 2-8 °C en posición vertical y protegido de la luz.

Utilizar protegido de la luz. Volver a guardar de inmediato en las condiciones indicadas tras su uso. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El producto es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se manipula debidamente.

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 sonda 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 a prueba de luz.

Indicaciones de peligro y consejos de prudencia:

El componente que determina el peligro es la formamida.



Peligro

H351	Susceptible de provocar cáncer.
H360FD	Puede perjudicar a la fertilidad. Puede dañar al feto.
H373	Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas.
P201	Solicitar instrucciones especiales antes del uso.
P202	No manipular antes de haber leído y comprendido todas las precauciones de seguridad.
P260	No respirar polvos/humos/gases/nieblas/vapores/aerosoles.
P280	Usar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara.
P308+P313	EN CASO DE exposición demostrada o supuesta: consultar a un médico.
P405	Guardar bajo llave.

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.
- La sonda solo debe utilizarse para detectar los locus descritos en 4. "Reactivos suministrados".
- 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

Preparar las muestras tal como se describe en las instrucciones de uso de ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

11. Preparación previa del producto

El producto está listo para usar. No precisa reconstitución, mezcla ni dilución. Llevar la sonda a temperatura ambiente (18-25 °C) antes del uso; proteger de la luz. Antes de abrir el frasco, mezclar en agitadora vortical y centrifugar brevemente.

12. Procedimiento de ensayo

Pretratamiento de la muestra

Realizar el pretratamiento de la muestra de acuerdo con las instrucciones de uso de ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

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. 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.

Post-hibridación

Realizar el procesamiento post-hibridación (lavado, contratinción, microscopia de fluorescencia) de acuerdo con las instrucciones de uso de ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

13. Interpretación de los resultados

Con el uso de juegos de filtros adecuados, las señales de hibridación de la sonda aparecen de color dorado (región del gen CDKN2A), rojo (CEN 3), verde (CEN 7) y azul (CEN 17).

Situación normal: En las interfases de células normales o células sin una deleción que implique la región del gen CDKN2A, se prevén dos señales doradas, dos rojas, dos verdes y dos azules (ver Fig. 2).

Situación anómala: En una célula con deleción de la región del gen CDKN2A, se observará un número reducido de señales doradas. Las deleciones que afectan solo a partes de la región del gen CDKN2A pueden dar lugar a un patrón de señal normal con señales doradas de tamaño reducido. En las células con aneuploidía de los cromosomas 3, 7 o 17, serán visibles más o menos señales del color correspondiente (ver Fig. 2).

Las señales superpuestas pueden aparecer como señales en color amarillo.

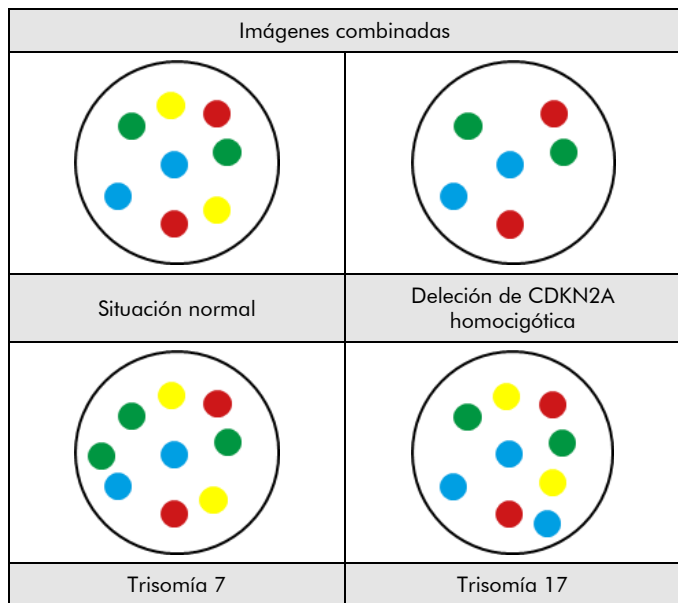


Fig. 2: Resultados previstos en núcleos normales y anómalos

Se puede observar otra distribución de señales en algunas muestras anómalas que podría dar lugar a un patrón de señal diferente al descrito anteriormente, lo que indica diferentes reordenaciones. Los patrones de señales no previstos se deben estudiar más a fondo.

Nota:

- Debido a la cromatina descondensada, las señales individuales de FISH pueden aparecer como pequeños grupos de señales. Por tanto, dos o tres señales del mismo tamaño, separadas por una distancia \leq al diámetro de una señal, deben contarse como una sola señal.
- No evaluar los núcleos superpuestos.
- No contar los núcleos sobredigeridos (que se reconocen por áreas oscuras visibles en el interior de los núcleos).
- No contar los núcleos con fuerte autofluorescencia, la cual dificulta el reconocimiento de señales.
- Un resultado negativo o inespecífico puede deberse a múltiples factores (ver el apartado 17).
- Para interpretar correctamente los resultados, el usuario debe validar este producto antes de utilizarlo en los procedimientos diagnósticos de acuerdo con las directrices nacionales o internacionales.

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

Exactitud: El lugar de la hibridación de la sonda se evaluó en extensiones metafásicas de un varón cariotípicamente normal. En todas las muestras analizadas, la sonda se hibridó únicamente con los locus esperados. No se observaron señales adicionales o hibridaciones cruzadas. Por lo tanto, se calculó que la exactitud era del 100 %.

Sensibilidad analítica: Para la evaluación de la sensibilidad analítica, la sonda se evaluó en extensiones metafásicas de varones cariotípicamente normales. Todos los núcleos mostraron el patrón de señal normal previsto en todas las muestras analizadas. Por lo tanto, se calculó que la sensibilidad analítica era del 100 %.

Especificidad analítica: Para la evaluación de la especificidad analítica, la sonda se evaluó en extensiones metafásicas de varones cariotípicamente normales. En todas las muestras analizadas, todas las señales se hibridaron únicamente con los locus objetivo esperados y no con otros locus. Por lo tanto, se calculó que la especificidad analítica era del 100 %.

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

- Antoni S, et al. (2017) *Eur Urol* 71: 96-108.
- Dimashkieh H, et al. (2013) *Cancer Cytopathol* 121: 591-7.
- Junker K, et al. (2006) *Cytogenet Genome Res* 114: 279-83.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Placer J, et al. (2002) *Eur Urol* 42: 547-52.
- Sokolova IA, et al. (2000) *J Mol Diagn* 2: 116-23.
- 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.