



## ZytoLight Aneuploidy Panel 18/X/Y and 13/21

REF Z-2279-20

Σ 20

Para la detección cualitativa de secuencias específicas de los cromosomas 13 y 21 humanos, así como de secuencias específicas del cromosoma 18 humano y satélites alfa de los cromosomas X e Y mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)



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

### 1. Uso previsto

ZytoLight Aneuploidy Panel 18/X/Y and 13/21 está diseñada para la detección cualitativa de secuencias específicas de los cromosomas 13 y 21 humanos, así como de secuencias específicas del cromosoma 18 humano y satélites alfa de los cromosomas X e Y en muestras citológicas o muestras fijadas en formol e incluidas en parafina mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). La sonda está prevista para su uso en combinación con ZytoLight FISH Implementation Kits (Ref. Z-2028-5/-20 o 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. 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.

### 3. Reactivos suministrados

ZytoLight Aneuploidy Panel 18/X/Y and 13/21 es un juego compuesto por dos sondas independientes:

- ZytoLight SPEC 18/CEN X/Y Triple Color Probe (Ref. Z-2163-200)
- ZytoLight SPEC 13/21 Dual Color Probe (Ref. Z-2164-200)

La sonda ZytoLight SPEC 18/CEN X/Y Triple Color Probe (PL119) se compone de:

- Polinucleótidos marcados en azul (excitación a 418 nm y emisión a 467 nm) ZyBlue (~37,0 ng/μl), dirigidos a secuencias localizadas en 18q21.31-q21.32\* (chr18:55,690,725-56,455,119) (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos marcados en verde (excitación a 503 nm/emisión a 528 nm) ZyGreen (~4,5 ng/μl), dirigidos a secuencias localizadas en Xp11.1-q11.1 específicas para la región centromérica satélite alfa DXZ1 del cromosoma X.
- Polinucleótidos marcados en naranja (excitación a 547 nm/emisión a 572 nm) ZyOrange (~1,5 ng/μl), dirigidos a secuencias localizadas en Yp11.1-q11.1 específicas para la región centromérica satélite alfa DYZ3 del cromosoma Y.
- Tampón de hibridación basado en formamida

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

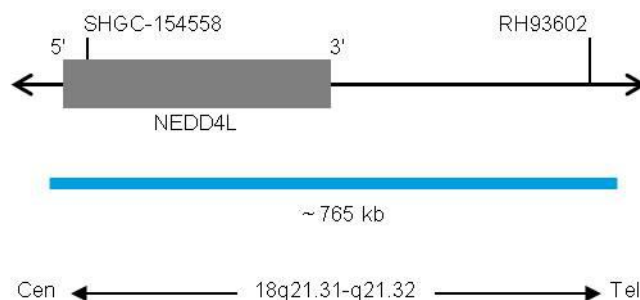


Fig. 1: SPEC 18 Mapa de la sonda (no está a escala)

La sonda ZytoLight SPEC 13/21 Dual Color Probe (PL120) se compone de:

- Polinucleótidos marcados en verde (excitación a 503 nm/emisión a 528 nm) ZyGreen (~10,0 ng/μl), dirigidos a secuencias localizadas en 13q12.11\* (chr13:20,200,365-20,892,494) (ver Fig. 2).
- Polinucleótidos marcados en naranja (excitación a 547 nm/emisión a 572 nm) ZyOrange (~4,5 ng/μl), dirigidos a secuencias localizadas en 21q22.13-q22.2\* (chr21:39,372,983-39,784,773) (ver Fig. 2).
- Tampón de hibridación basado en formamida

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

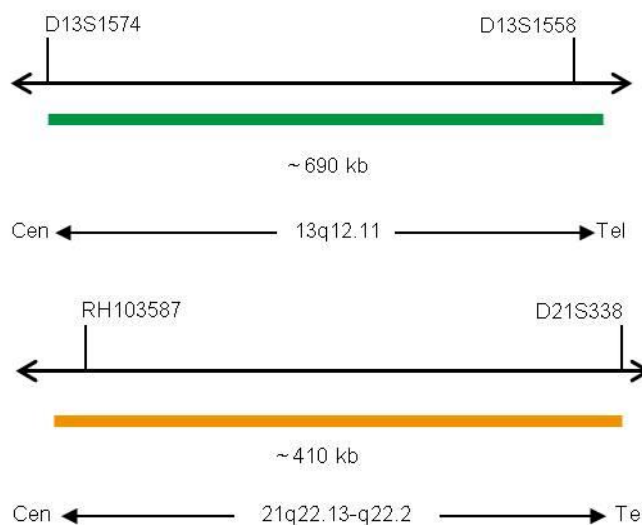


Fig. 2: Arriba: SPEC 13q12.11 Mapa de la sonda; abajo: SPEC 21q22.13-q22.2 Mapa de la sonda (no está a escala)

ZytoLight Aneuploidy Panel 18/X/Y and 13/21 está disponible en un tamaño:

- Z-2279-20: Las sondas individuales son suficiente para 20 reacciones de 10 µl cada una.

#### 4. Material necesario no suministrado

- Muestras de control positivas y negativas
- Hibridador o placa térmica
- Hibridador o cámara húmeda en horno de hibridación
- Cronómetro
- Cubetas o baños de tinción
- Termómetro calibrado
- Pipetas ajustables (10 µl, 25 µl)
- Alcohol reactivo o etanol
- 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

#### Muestras citológicas

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Ref. Z-2099-20)
- Portaobjetos para microscopio, no recubiertos
- Baño María (70 °C)
- Formaldehído sin ácidos al 37 % o formol tamponado neutro al 10 %
- 2x citrato de sodio salino (SSC), p. ej., 20x SSC Solution (Ref. WB 0003-50)

#### Muestras fijadas en formol e incluidas en parafina

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Ref. Z-2028-5/-20)
- Portaobjetos para microscopio, con carga positiva
- Baño María (37 °C, 98 °C)
- Xileno

#### 5. 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.

#### 6. 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.

#### 7. 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 3. "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.

#### 8. Sustancias interferentes

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

Los siguientes fijadores son incompatibles con FISH:

- 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

## 9. Preparación de muestras

### Muestras citológicas

- Preparar las muestras tal como se describe en las instrucciones de uso de [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#).

### Muestras fijadas en formol e incluidas en parafina

- 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.

## 10. 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 vorticial y centrifugar brevemente.

## 11. Procedimiento de ensayo

### Muestras citológicas

#### 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

- Pipetear 10  $\mu\text{l}$  de la sonda en cada muestra pretratada.
- 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.*

- Colocar los portaobjetos en una placa térmica o un hibridador y desnaturalizar las muestras durante 5 minutos a 72 °C.
- Realizar la hibridación durante 2 h hasta 16 h (es decir, durante la noche) a 37 °C, ya sea transfiriendo los portaobjetos a un hibridador o 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](#).

### Muestras fijadas en formol e incluidas en parafina

#### Pretratamiento de la muestra

Realizar el pretratamiento de la muestra (desparafinación, proteólisis) de acuerdo con las instrucciones de uso de [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

#### Desnaturalización e hibridación

- Pipetear 10  $\mu\text{l}$  de la sonda en cada muestra pretratada.
- 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.*

- Colocar los portaobjetos en una placa térmica o un hibridador y desnaturalizar las muestras durante 10 minutos a 75 °C.
- 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.*

#### Post-hibridación

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

## 12. 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.

## 13. Características de rendimiento

### Muestras citológicas

El rendimiento se evaluó de acuerdo con las instrucciones de uso de [ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit](#).

**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 %.

### Muestras fijadas en formol e incluidas en parafina

El rendimiento se evaluó de acuerdo con las instrucciones de uso de [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

**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 %.

## 14. Eliminación

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

## 15. Resolución de problemas

Cualquier desviación de las instrucciones de uso puede producir resultados de tinción inferiores o ausencia de tinción. Algunos de los consejos de este apartado solo se aplican cuando se utiliza [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

**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 o aplicar un paso posterior a la fijación como se describe en "Procedimiento de ensayo" del manual de <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
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.
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
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
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
La muestra celular o tisular no se ha fijado correctamente	Optimizar el tiempo de fijación y el fijador o aplicar un paso posterior a la fijación como se describe en "Procedimiento de ensayo" del manual de <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
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

**Núcleos superpuestos**

Posible causa	Medida
Grosor inadecuado de los cortes histológicos	Preparar cortes de micrótopo de 2-4 µm

**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

**16. Bibliografía**

- Kieivits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* **53**: 134-6.
- Klinger K, et al. (1992) *Am J Hum Genet* **51**: 55-65.
- Korenberg JR, et al. (1990) *Am J Hum Genet* **47**: 236-46.
- Wayne JS, Willard HF (1987) *Nucleic Acids Res* **15**: 7549-69.
- 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 ZytoLight® son marcas comerciales de ZytoVision GmbH.