*Zyto**Light***
SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe

REF Z-2015-50	Σ 5 (0,05 ml)
REF Z-2015-200	Σ 20 (0,2 ml)

Para la detección cualitativa de amplificaciones del gen ERBB2 humano y de satélites alfa del cromosoma 17 mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

4250380P038QW

CE 0483 IVD

Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*

conforme al Reglamento (UE) 2017/746 (IVDR)

1. Uso previsto

El producto Zyto*Light* SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (**PL8**) está previsto para su uso en la detección cualitativa de amplificaciones que afectan al gen ERBB2 humano y la detección de satélites alfa del cromosoma 17 en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina, como cáncer de mama y cáncer en la unión gastroesofágica, mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). La sonda está prevista para su uso en combinación con Zyto*Light* FISH-Tissue Implementation Kit (Ref. Z-2028-5/-20).

El producto es para uso exclusivo profesional. Todas las pruebas que utilicen este producto debe llevarlas a cabo personal cualificado, bajo la supervisión de un anatomopatólogo/genetista humano, en un laboratorio de anatomía patológica certificado y autorizado.

La sonda está prevista para su uso como ayuda en el diagnóstico diferencial de cáncer de mama y cáncer en la unión gastroesofágica, por lo que no hay que tomar medidas terapéuticas basándose únicamente en el resultado de la prueba.

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

La sonda Zyto*Light* SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe 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 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308), que alberga la región del gen ERBB2 (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos marcados en naranja (excitación a 547 nm/emisión a 572 nm) ZyOrange (~1,5 ng/µl), dirigidos a secuencias localizadas en 17p11.1-q11.1 específicas para la región centromérica satélite alfa D17Z1 del cromosoma 17 (ver Fig. 1).
- Tampón de hibridación basado en formamida.

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

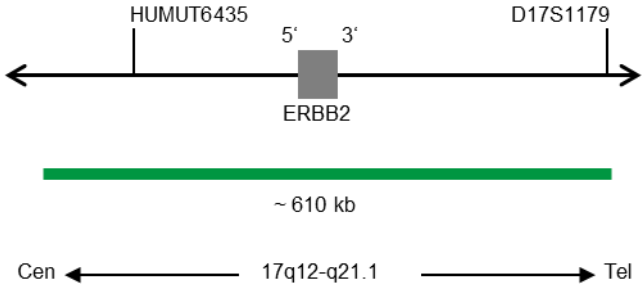

Fig. 1. SPEC ERBB2 Mapa de la sonda (no está a escala)

El producto Zyto*Light* SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe está disponible en dos tamaños:

- Z-2015-50: 0,05 ml (5 reacciones de 10 µl cada una)
- Z-2015-200: 0,2 ml (20 reacciones de 10 µl cada una)

4. Material necesario no suministrado

- Zyto*Light* FISH-Tissue Implementation Kit (Ref. Z-2028-5/-20)
- 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 × 22 mm, 24 mm × 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

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).

- Notificar cualquier incidente grave que se produzca en relación con el producto al fabricante y a la autoridad competente, de conformidad con la normativa local.
- 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, a menos que se permita expresamente su reutilización.
- 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	Se sospecha que provoca 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 la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.
P260	No respirar el polvo/el humo/el gas/ la niebla/los vapores/el aerosol.
P280	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P308+P313	EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: consultar a un médico.
P405	Guardar bajo llave.

7. Limitaciones

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Solo para uso profesional.
- Únicamente para uso no automatizado.
- La interpretación clínica de una tinción positiva, o de su ausencia, debe hacerse en el contexto de la historia clínica, la morfología y otros criterios histopatológicos, así como de otras pruebas diagnósticas. Es responsabilidad del anatomopatólogo/genetista humano 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/genetista humano 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 puede variar el rendimiento y debe ser validada por el usuario. Este producto sanitario para diagnóstico *in vitro* (IVD) solo está certificado con marcado CE cuando se utiliza conforme a estas instrucciones de uso en el ámbito de utilización previsto.

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

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

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

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

1. Pipetear 10 µl de la sonda en cada muestra pretratada.
2. Cubrir las muestras con un cubreobjetos de 22 mm × 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. 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. Interpretación de los resultados

Con el uso de juegos de filtros adecuados, las señales de hibridación de la sonda aparecen en color verde (región del gen ERBB2) y naranja (CEN 17).

Situación normal: En las interfases de células normales o de células sin una amplificación que afecte a la región del gen ERBB2, aparecen dos señales verdes y dos naranjas (ver Fig. 2).

Situación anómala: En las células con una amplificación de la región del gen ERBB2, se observará un mayor número de señales verdes o grupos de señales verdes (ver Fig. 2).

Las señales superpuestas pueden aparecer como señales en color amarillo.

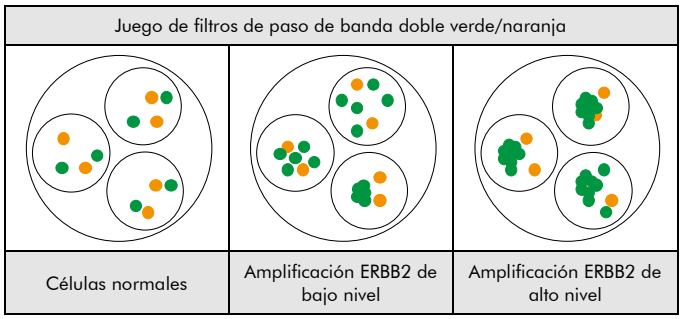

Fig. 2. Resultados previstos en núcleos normales y anómalos

En algunas muestras anómalas pueden observarse patrones de señal distintos de los descritos anteriormente. Estos patrones de señal 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 ≤ 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 16 «Resolución de problemas»).
- 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.

13. 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.

14. Características de rendimiento

14.1 Rendimiento analítico

El rendimiento se evaluó de acuerdo con las instrucciones de uso de ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Sensibilidad analítica:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Especificidad analítica:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

Se analizó la reproducibilidad día a día comparando los resultados obtenidos por un analista en 10 días diferentes y evaluando la concordancia.

	Porcentaje de acuerdo
muestra negativa	100%
muestra positiva	100%

Se analizó la repetibilidad comparando los resultados replicados obtenidos por un analista en 10 días diferentes y evaluando la concordancia.

	Porcentaje de acuerdo
muestra negativa	100%
muestra positiva	100%

14.2 Rendimiento clínico

Sensibilidad diagnóstica:	**Cáncer de mama:** 93% (95% CI 91.0 – 95.0) basado en un modelo bivariante **Cáncer gástrico y cáncer de la unión gastroesofágica:** 88% (95% CI 74.0 – 95.0) basado en un modelo bivariante
Especificidad diagnóstica:	**Cáncer de mama:** 98% (95% CI 97.0 – 99.0) basado en un modelo bivariante **Cáncer gástrico y cáncer de la unión gastroesofágica:** 95% (95% CI 92.0 – 97.0) basado en un modelo bivariante

15. Eliminación

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

16. Resolución de problemas

Cualquier desviación de las instrucciones de uso puede producir resultados de tinción inferiores o ausencia de tinción. Para obtener más información, visite www.zytovision.com.

Señales débiles o ausencia de señales

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 ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
El pretratamiento proteolítico no se ha 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
Se han utilizado juegos de filtros inadecuados	Utilizar juegos de filtros adecuados para los fluorocromos de la sonda. *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*

Señales de hibridación cruzada; ruido de fondo

Posible causa	Medida
Desparafinación incompleta	Utilizar soluciones recién preparadas; comprobar la duración de la desparafinación
Pretratamiento proteolítico demasiado intenso	Reducir el tiempo de incubación con pepsina

Los portaobjetos se enfriaron a temperatura ambiente antes de la hibridación	Transferir los portaobjetos rápidamente a 37 °C

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 ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
El pretratamiento proteolítico no se ha realizado correctamente	Optimizar el tiempo de incubación con pepsina, 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 micrótomo de 2-4 µm

La muestra se desliza fuera del portaobjetos

Posible causa	Medida
Pretratamiento proteolítico demasiado intenso	Reducir el tiempo de incubación con pepsina

Contratinción débil

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

17. Bibliografía

- Brockhoff G, et al. (2016) *Histopathology 69*: 635-646.
- Gajaria PK, et al. (2020) *Indian J Pathol Microbiol 63*: 1
- Hwang CC*, et al.* (2011) *Histopathology 59*: 984-992.
- Holten-Rossing H, et al. (2015) *Breast Cancer Res Treat 152*: 367-375.
- Jensen SG, et al. (2020) *Apmis 128*: 573-582.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet 53*: 134-6.
- Köseoğlu RD, et al. (2019) *Eur J Breast Health 15*: 43.
- Nielsen SL, et al. (2017) *Appl Immunohistochem Mol Morphol 25*: 320-328.
- Page R, et al. (2022) *PloS one 17(6)*: e0270139
- Pfarr N, et al. (2017) *Genes Chromosomes Cancer 56*: 255-265.
- Schindlbeck C, et al. (2010) *J Cancer Res Clin Oncol 136*: 1029-1037.
- Staněk L, et al. (2014) *Mol Med Rep 10*: 2669-2674.
- Tabarestani S, et al. (2015) *Asian Pac J Cancer Prev 16*: 7997-8002.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revisión

Revisión	Descripción del cambio
4.1.1	Cambio de organismo notificado 14. Características de rendimiento Añadir precisión

www.zytovision.com

Para consultar las instrucciones de uso más recientes y su versión en distintos idiomas, visite www.zytovision.com.

Nuestros expertos están a su disposición para resolver cualquier duda.
Póngase en contacto con helptech@zytovision.com
Para obtener el resumen de seguridad y rendimiento, consulte www.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.