



**ZytoLight**

**SPEC ESR1/CEN 6 Dual Color Probe**

**REF** Z-2069-50  5 (0,05 ml)

**REF** Z-2069-200  20 (0,2 ml)

Para la detección cualitativa de amplificaciones del gen ESR1 humano y satélites alfa del cromosoma 6 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 SPEC ESR1/CEN 6 Dual Color Probe (PL27) está diseñada para la detección cualitativa de amplificaciones del gen ESR1 humano y satélites alfa del cromosoma 6 en 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-Tissue Implementation Kit (Ref. Z-2028-5/-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 gen ESR1 (receptor estrogénico 1) se encuentra en la región cromosómica 6q25.1 y codifica el receptor estrogénico (RE) alfa. La expresión de RE es uno de los factores más importantes en el desarrollo del cáncer de mama, y evaluar su estado mediante inmunohistoquímica es crucial para determinar el uso de antagonistas de los receptores estrogénicos. Se ha descrito con frecuencia la amplificación del gen ESR1 en tumores de mama positivos para RE. Además, se ha demostrado hace poco que, en pacientes con cáncer de mama que reciben monoterapia adyuvante con tamoxifeno, la supervivencia es significativamente mayor en los casos de amplificación del gen ESR1, según determinación mediante FISH, en comparación con los casos con resultados inmunohistoquímicos positivos para RE sin amplificación génica. También se ha demostrado que la respuesta al tamoxifeno depende del número absoluto de copias de ESR1. Por lo tanto, la determinación de la amplificación de ESR1 permite identificar a un subgrupo de pacientes con cáncer de mama que presenta mayor probabilidad de responder al tratamiento antiestrogénico.

### 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 contratención 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 SPEC ESR1/CEN 6 Dual Color Probe se compone de:

- Polinucleótidos marcados en verde (excitación a 503 nm/emisión a 528 nm) ZyGreen (~10 ng/μl), dirigidos a secuencias localizadas en 6q25.1\* (chr6:152,083,365-152,478,947) que albergan la región del gen ESR1 (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 6p11.1-q11 específicas para la región centromérica satélite alfa D6Z1 del cromosoma 6.
- Tampón de hibridación basado en formamida

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

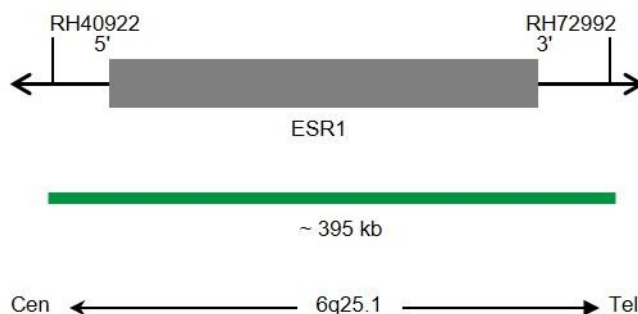


Fig. 1: SPEC ESR1 Mapa de la sonda (no está a escala)

La sonda ZytoLight SPEC ESR1/CEN 6 Dual Color Probe está disponible en dos tamaños:

- Z-2069-50: 0,05 ml (5 reacciones de 10 μl cada una)
- Z-2069-200: 0,2 ml (20 reacciones de 10 μl cada una)

### 5. Material necesario no suministrado

- ZytoLight 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 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

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.

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

## 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 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.

## 12. 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  $\mu\text{l}$  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 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, microscopía de fluorescencia) de acuerdo con las instrucciones de uso de [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

### 13. 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 ESR1) y naranja (CEN 6).

**Situación normal:** En las interfases de células normales o células sin una amplificación que implique la región del gen ESR1, aparecen dos señales verdes y dos naranjas (ver Fig. 2).

**Situación anómala:** En células con una amplificación de la región del gen ESR1 se observará un aumento del número de señales verdes o grupos de señales verdes (ver Fig. 2).

*Las señales superpuestas pueden aparecer como señales en color amarillo.*

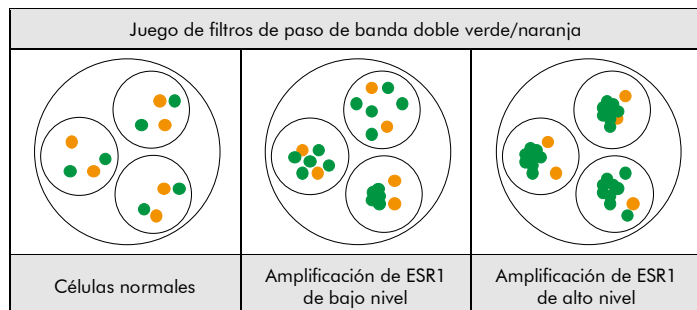


Fig. 2: Resultados previstos en núcleos normales y anómalos

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, por ejemplo, los fibroblastos.

**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   |
| 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 <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i>  |
| 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 tisular 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 <a href="#">ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</a> |
| 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 micrótomo 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 <a href="#">DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</a> (Ref. MT-0008-0.8) en su lugar |
| Tiempo de incubación de DAPI demasiado corto | Ajustar el tiempo de incubación de DAPI  |

**18. Bibliografía**

- Burkhardt L, et al. (2010) *Breast Cancer Res Treat* 123: 757-65.
- Holst F, et al. (2007) *Nature Genet* 39: 655-60.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Lacroix M (2006) *Endocr Relat* 13: 1033-67.
- Moelans CB, et al. (2010) *Anal Cell Pathol* 33: 13-8.
- Nembrot M, et al. (1990) *Biochem Biophys Res Comm* 166: 601-7.
- Nessling M, et al. (2005) *Cancer Res* 65: 439-47.
- Pentheroudakis G, et al. (2013) *PLoS One* 8: e70634.
- Rahman MT, et al. (2013) *Anticancer Res* 33: 3775-81.
- Sassen A, et al. (2009) *Breast Cancer Res* 11: R50.
- Tomita S, et al. (2009) *Cancer Sci* 100: 1012-7.
- 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.