*Zyto**Light***
SPEC CCND1/IGH Dual Color Dual Fusion Probe

REF	Z-2125-50	Σ	5 (0,05 ml)
REF	Z-2125-200	Σ	20 (0,2 ml)

Para la detección cualitativa de la translocación t(11;14)(q13.3;q32.3) mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

4250380P182R6

CE 0483

IVD

Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*

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

1. Principio del ensayo

El producto Zyto*Light* SPEC CCND1/IGH Dual Color Dual Fusion Probe (**PL82**) está previsto para su uso en la detección cualitativa de la translocación t(11;14)(q13.3;q32.3) 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 Zyto*Light* FISH Implementation Kits (Ref. Z-2028-5/-20 o Z-2099-20).

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 varios tipos de cáncer, 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 CCND1/IGH Dual Color Dual Fusion Probe se compone de:

- Polinucleótidos marcados en naranja (excitación a 547 nm/emisión a 572 nm) ZyOrange (~6 ng/µl), dirigidos a secuencias localizadas en 11q13.3* (chr11:68,522,105-70,031,240) que albergan la región del gen CCND1 (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos marcados en verde (excitación a 503 nm/emisión a 528 nm) ZyGreen (~12 ng/µl), dirigidos a secuencias localizadas en 14q32.33* (chr14:105,462,169-106,995,000) que albergan el locus IGH (ver Fig. 1).
- Tampón de hibridación basado en formamida.

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

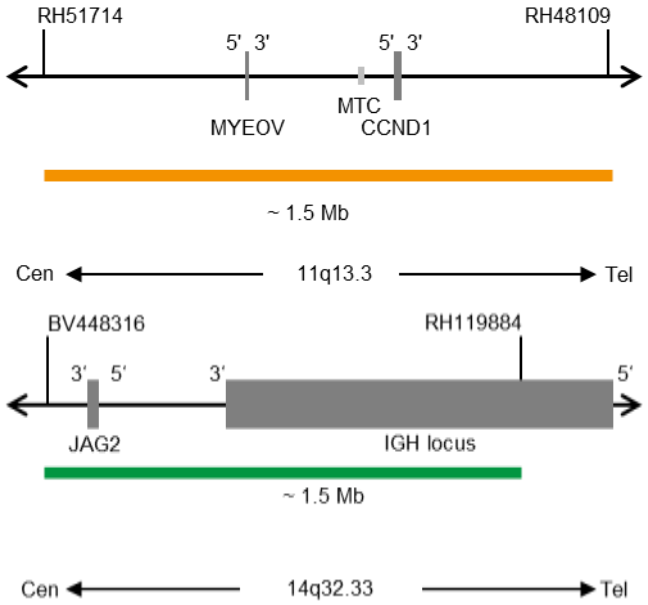

Fig. 1. Arriba: SPEC CCND1 Mapa de la sonda; abajo: SPEC IGH Mapa de la sonda (no está a escala)

El producto Zyto*Light* SPEC CCND1/IGH Dual Color Dual Fusion Probe está disponible en dos tamaños:

- Z-2125-50: 0.05 ml (5 reacciones de 10 µl cada una)
- Z-2125-200: 0.2 ml (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 × 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

Muestras citológicas

- Zyto*Light* 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 %
- 2 × 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).
- 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.
- El valor de corte analítico normal para el patrón de señal anómala de interés debe establecerlo un anatomopatólogo/genetista humano cualificado.
- 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 el apartado 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 del kit de implementación ZytoVision correspondiente.

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 (desparafinación, proteólisis) 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 × 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. 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-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

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 naranja (región del gen CCND1) y verde (locus IGH).

Situación normal: En las interfases de células normales o células sin una translocación que afecte a las regiones génicas correspondientes, aparecen dos señales independientes de color verde y naranja (ver Fig. 2).

Situación anómala Una fusión génica se indica mediante una señal naranja independiente, una señal verde independiente y dos señales de fusión naranja/verde (ver Fig. 2).

Las señales superpuestas pueden aparecer como señales en color amarillo.

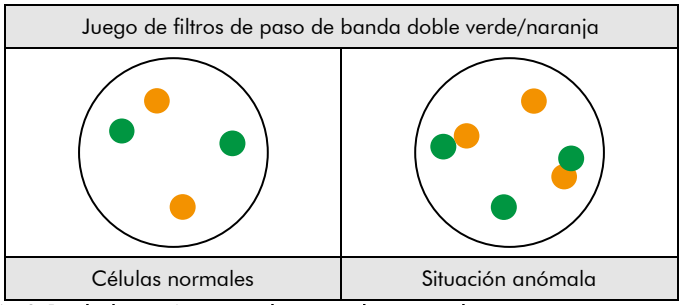

Fig. 2. Resultados previstos en núcleos normales y anómalos

Debido a las secuencias homólogas de IGH en 16p11.2 y 15q11.2, se pueden observar hibridaciones cruzadas débiles.

Otros patrones de señal anómalos pueden ser causados por la pérdida completa o parcial de los genes IGHC o IGHV, así como por inserciones crípticas en otros locus. Además, las señales verdes ausentes o disminuidas en uno o ambos alelos podrían representar deleciones de genes IGHV resultantes de la recombinación V-D-J somática normal.

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 Muestras citológicas

El rendimiento se evaluó de acuerdo con las instrucciones de uso de ZytoLight FISH-Cytology 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 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.

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%

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. Algunos de los consejos de este apartado solo se aplican cuando se utiliza ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit. 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

- 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.
- Wlodarska I, et al. (2007) *J Mol Diagn* 9: 47-54.
- Quintero-Rivera F, et al. (2009) *Cancer Genet and Cytogenet* 190: 33-9.

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.