



F/*ex*SH

ALK/ROS1 DistinguSH Probe

REF Z-2203-50	5 (0,05 ml)
REF Z-2203-200	20 (0,2 ml)

Para la detección cualitativa de translocaciones que afectan al gen ALK humano en 2p23.1-p23.2 y el gen ROS1 humano en 6q22.1 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 **F/*ex*SH ALK/ROS1 DistinguSH Probe (PL161)** está diseñada para la detección cualitativa de translocaciones que afectan al gen ALK humano en 2p23.1-p23.2 y el gen ROS1 humano en 6q22.1 en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina, como tejido de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). La sonda está prevista para su uso en combinación con **F/*ex*SH FISH-Tissue Implementation Kit** (Ref. Z-2182-5/-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

Tanto el gen ALK como el gen ROS1 codifican tirosinas cinasas receptoras transmembranarias. Las reordenaciones que afectan al locus de los genes ALK o ROS1 se observan con frecuencia en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). La reordenación de ALK más frecuente en el CPNM es una inversión que afecta a los genes ALK y EML4, ambos localizados en el cromosoma 2 [inv(2)(p21p23)]. Esta inversión produce una proteína de fusión que se activa de forma constitutiva a través de la autofosforilación y que, a su vez, interviene en la transformación maligna de las células al activar los efectores posteriores. En el CPNM se han detectado varios genes de translocación recíproca de ROS1 y todos dan lugar a la fusión de formas truncadas variables de, por ejemplo, TPM3, SDC4, SLC34A2, CD74, EZR o LRIG3 para el dominio cinasa de ROS1. También se ha observado que GOPC se fusiona con ROS1 en el CPNM. Las fusiones GOPC-ROS1 producen una eliminación intersticial de aproximadamente 240 kb en 6q22.1. El gen ROS1 está estrechamente relacionado desde el punto de vista evolutivo con la familia ALK, que forma parte de la base científica del uso de los inhibidores de ALK como inhibidores de ROS1. Los pacientes con CPNM positivo para ALK y ROS1 se benefician de los tratamientos dirigidos con inhibidores de la tirosina cinasa, como por ejemplo, crizotinib. Por lo tanto, la detección de reordenaciones de ALK y ROS1 mediante hibridación *in situ* con fluorescencia tiene importancia terapéutica.

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 **F/*ex*SH ALK/ROS1 DistinguSH Probe** se compone de:

- Polinucleótidos marcados en verde (excitación a 503 nm/emisión a 528 nm) ZyGreen (~10 ng/ μ l), dirigidos a secuencias localizadas en 2p23.1-p23.2* (chr2:29,460,144-30,095,822) proximales a la región del punto de ruptura de ALK y en 6q22.1* (chr6:116,912,298-117,627,255) proximales a la región del punto de ruptura de ROS1 (ver Fig. 1 y Fig. 2).
- Polinucleótidos marcados en naranja (excitación a 547 nm/emisión a 572 nm) ZyOrange (~2,5 ng/ μ l), dirigidos a secuencias localizadas en 2p23.2* (chr2:29,174,204-29,383,335) distales a la región del punto de ruptura de ALK y en 6q22.1* (chr6:117,659,135-117,871,701) distales a la región del punto de ruptura de ROS1 (ver Fig. 1 y Fig. 2).
- Polinucleótidos marcados en azul (excitación a 418 nm/emisión a 467 nm) ZyBlue (~70,0 ng/ μ l) dirigidos a secuencias localizadas en 6q22.1* (chr6:116,671,642-117,260,761) proximales a la región del punto de ruptura de ROS1 que se localizan conjuntamente con los polinucleótidos ROS1 marcados en verde, y en 6q22.1-q22.2* (chr6:117,765,211-118,444,005) distales a la región del punto de ruptura de ROS1 que se localizan conjuntamente con los polinucleótidos ROS1 marcados en naranja (ver Fig. 2).
- Tampón de hibridación basado en formamida

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

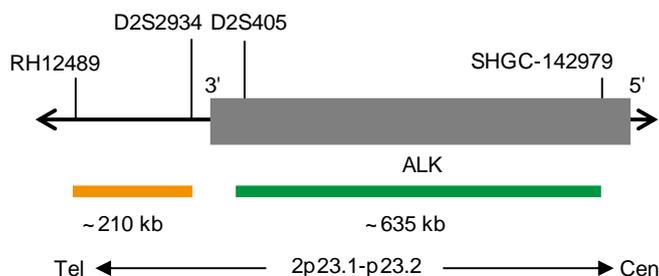


Fig. 1: ALK Mapa de la sonda (no está a escala)

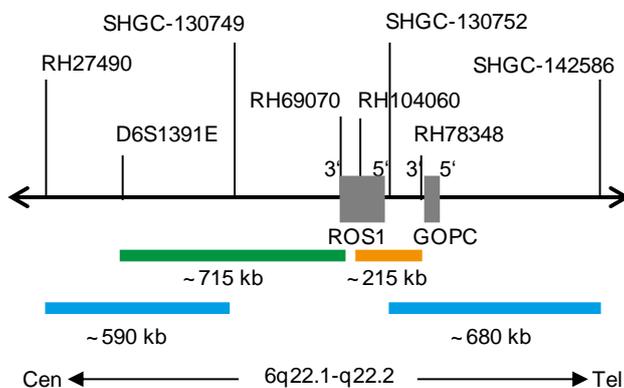


Fig. 1: ROS1 Mapa de la sonda (no está a escala)

La sonda F/exISH ALK/ROS1 DistinguISH Probe está disponible en dos tamaños:

- Z-2203-50: 0,05 ml (5 reacciones de 10 µl cada una)
- Z-2203-200: 0,2 ml (20 reacciones de 10 µl cada una)

5. Material necesario no suministrado

- F/exISH FISH-Tissue Implementation Kit (Ref. Z-2182-5/-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

- 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.
- 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.

Indicaciones de peligro y consejos de prudencia:

El componente que determina el peligro es la formamida.



Peligro

H319	Provoca irritación ocular grave.
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.
P260	No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
P280	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P305+P351+P338	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.
P308+P313	EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.
P337+P313	Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

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 ISH:

- 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

Preparar las muestras tal como se describe en las instrucciones de uso de FlexISH-Tissue 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 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 FlexISH 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 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. 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 FlexISH 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 (proximales a la región del punto de ruptura de ALK y ROS1), naranja (distales a la región del punto de ruptura de ALK y ROS1) y azul (proximales y distales a la región del punto de ruptura ROS1).

Situación normal: En las interfases de células normales o células sin reordenación que afecta a la región del gen ALK o ROS1, aparecen cuatro señales de fusión verdes o naranjas cuando se utiliza un juego de filtros de paso de banda doble adecuado, y aparecen dos señales azules cuando se utiliza un juego de filtros de paso de banda simple adecuado (ver Fig. 3).

Situación anómala: Una región del gen ALK afectada por una translocación se indica mediante una señal verde independiente y una señal naranja independiente que no se localizan conjuntamente con señales azules. La pérdida de una señal verde que da lugar a una señal naranja aislada es el resultado de una delección de secuencias de 5'-ALK. Una región del gen ROS1 afectada por una translocación se indica mediante una señal verde independiente y una señal naranja independiente que se localizan conjuntamente con una señal azul. La pérdida de una señal naranja que da lugar a una señal verde aislada que se localiza conjuntamente con una señal azul es el resultado de una delección distal a la región del punto de ruptura de ROS1 o debido a una translocación desequilibrada que afecta a esta región cromosómica (ver Fig. 3).

Las señales superpuestas pueden aparecer como señales en color amarillo.

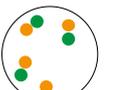
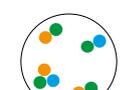
	Juego de filtros de paso de banda doble verde/naranja	Juego de filtros de paso de banda única azul	Imagen combinada o juego de filtros de paso de banda triple
Células normales			
Reordenación de ALK	 	 	 
Reordenación de ROS1	 	 	 

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
La muestra no se ha fijado correctamente	Optimizar el tiempo de fijación y el fijador
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

Núcleos superpuestos

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

Morfología tisular degradada

Posible causa	Medida
La muestra no se ha fijado correctamente	Optimizar el tiempo de fijación y el fijador
Pretratamiento proteolítico no realizado correctamente	Optimizar el tiempo de incubación con pepsina
Secado insuficiente antes de la aplicación de la sonda	Prolongar el secado al aire

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 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

18. Bibliografía

- Bergeth K, et al. (2012) *J Clin Oncol* 30: 863-70.
- Birchmeier C, et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci* 84: 9270-74.
- Bos M, et al. (2013) *Lung Cancer* 81: 142-3.
- Brockhoff G, et al. (2016) *Histopathology* 69: 635-46.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Koivunen JP, et al. (2008) *Clin Cancer Res* 14: 4275-83.
- Martelli MP, et al. (2009) *Am J Pathol* 174: 661-70.
- Morris SW, et al. (1994) *Science* 263: 1281-4.
- Ou SH, et al. (2012) *Exp Rev Anticancer Ther* 12: 447-56.
- Palmer RH, et al. (2009) *Biochem J* 420: 345-61.
- Sasaki T, et al. (2010) *Eur J Cancer* 46: 1773-80.
- Selinger CI, et al. (2017) *Histopathology* 70: 402-411.
- Shaw AT, et al. (2014) *N Engl J Med* 371: 1963-71.
- 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 F/exSH® son marcas comerciales de ZytoVision GmbH.