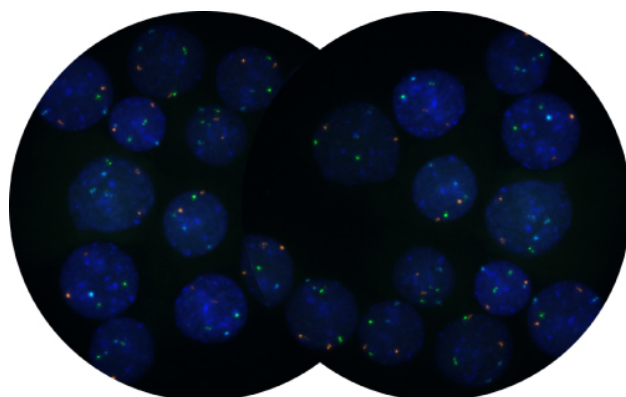




Sonda FISH de ADN CytoTest

Instrucciones de uso



Aplicable a los siguientes grupos de referencia
CT-PAC
CT-LSP
CT-CCP

Tabla de contenidos

Información del producto

Guía de símbolos.....	3
Usuario previsto.....	3
Nombre común del producto.....	3
Uso previsto.....	3
Indicaciones de uso.....	3
Contraindicaciones.....	4
Principios del procedimiento.....	4
Descripción del producto.....	4
Advertencias y precauciones.....	5
Almacenamiento y manipulación.....	5
Materiales proporcionados.....	5
Equipo de laboratorio requerido pero no proporcionado.....	5

Procedimiento de ensayo

<u>Procedimiento FISH para muestras FFPE</u>	
Reactivos necesarios pero no provistos.....	6
Preparación de las soluciones de trabajo.....	6
Procedimiento FISH para secciones de tejido embebido en parafina.....	7
<u>Procedimiento FISH para muestras citológicas</u>	
Reactivos necesarios pero no provistos.....	8
Preparación de las soluciones de trabajo.....	8
Procedimiento FISH para citología.....	9
<u>Procedimiento FISH para muestras de líquido amniótico</u>	
Reactivos necesarios pero no provistos.....	10
Preparación de las soluciones de trabajo.....	10
Procedimiento FISH para amniocitos.....	12

Interpretación de resultados

Patrones de señales para sondas de amplificación/eliminación.....	14
Patrones de señales para sondas de separación.....	14
Patrones de señales para sondas de fusión/translocación.....	14

Suplementos

Referencias.....	15
Información del fabricante.....	15
Información del representante autorizado en la Comunidad Europea.....	15

INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

Guía de símbolos



Número de catálogo



Nombre y dirección del Fabricante



Dispositivo médico de diagnóstico *In vitro*



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Contiene suficientes reactivos para < n > pruebas



Riesgos biológicos



Número de lote



Consultar instrucciones de uso



Usar antes de AAAA-MM-DD



Temperatura mínima/máxima



No estéril

Usuario previsto

Las Sondas FISH CytoTest son **solo para uso profesional**.

Nombre común del producto

Sondas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de ADN

Uso previsto

La Sonda FISH está diseñada para su uso en un ensayo para detectar anomalías citogenéticas o cromosómicas conocidas o sospechadas.

Indicaciones de uso

La evaluación inicial de muchas enfermedades hematológicas y otras afecciones malignas típicamente incluye análisis morfológicos, histológicos, inmunofenotípicos (citometría de flujo y/o análisis de inmunohistoquímica) y análisis citogenéticos convencionales. Los análisis FISH pueden ser un componente integrante de la evaluación diagnóstica de cualquier enfermedad que tenga que ver con aberraciones genómicas, además del cariotipado convencional o luego de él, pero particularmente en casos de:

1. Anormalidades con baja frecuencia, pero con porcentajes bien documentados, de resultados citogenéticos de falso negativo, sobre todo en situaciones en donde los parámetros clínicos, hematológicos y patológicos sugieren una anomalía específica
2. Anormalidades con una alta frecuencia de citogenética de "falso negativo"

3. Análisis interfase, cuando la citogenética convencional falla o resulta imposible, por ejemplo, en tejidos fijos
4. Para aclarar hallazgos cariotípicos convencionales anormales o complejos; o
5. Como marcador indirecto para un evento genético primario

Contraindicaciones

El dispositivo está sujeto a las siguientes limitaciones:

1. Este producto no está diseñado para usos de alto riesgo, como por ejemplo selección de terapia, predicción de respuesta terapéutica o evaluación en busca de enfermedades. No se ha establecido el uso de este dispositivo para evaluar riesgos, controlar enfermedades, y realizar diagnósticos y pronósticos.
2. La información clínica, patológica y otra información relevante siempre deben correlacionarse con los resultados de la prueba FISH en las muestras de los pacientes. Se debe tener en cuenta el estado clínico de los pacientes al realizar la prueba y utilizar los resultados.
3. La prueba FISH no es apropiada para determinar las siguientes anomalías:
 - a. Una o más mutaciones puntuales en ADN objetivo, o
 - b. Cualquier otra aberración única a nivel nucleótidos,
 - c. Pequeñas (por debajo del rango kb) eliminaciones, inserciones, inversiones
 - d. Identificación del punto de ruptura con precisión a nivel par de bases
4. Esta prueba no permite determinar el nivel de expresión genética o el tipo de transcripción, y no incluye medición de la cantidad o integridad de producto genético.
5. Interpretación de los resultados: En raros casos, es posible que se observen patrones inusuales de puntos/señales. Estos patrones inesperados podrían tener un significado desconocido y es posible que no puedan interpretarse solamente con esta prueba. Un análisis de metafase podría resultar útil para la caracterización de algunos patrones de señales atípicos o inesperados.
6. Las características de desempeño de la sonda FISH han sido validadas en muestras de linfocitos en sangre periférica humana y muestras de tejido.
7. El uso del dispositivo para realizar pruebas en otros tipos de muestras posiblemente no se haya probado a fondo y requiere optimización y ajustes del protocolo.

Principios del procedimiento

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) es una potente técnica diseñada para detectar la presencia o ausencia, ubicación, integridad y cantidad de secuencias de ADN o ARN en tejidos, células o cromosomas. FISH está basada en la detección de secuencias específicas al emparejar bases (hibridación) en cadenas únicas complementarias de ácido nucleico. Aquí, una de las cadenas es un fragmento de secuencia etiquetado fluorescentemente (sonda) que solo se une a aquellas partes del genoma con secuencias altamente o completamente complementarias a la secuencia de la sonda, y la otra cadena está presente en el material de muestra a analizar. Por lo tanto, la hibridación *in situ* comienza con la preparación de la muestra a analizar y con la preparación de la sonda. El ADN típicamente de doble cadena en la muestra se debe fundir (desnaturalizar) en cadenas simples, y la sonda se debe etiquetar fluorescentemente para permitir su detección.

Descripción del producto

Las sondas FISH CytoTest son dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* fabricadas con ADN genómico obtenido de cromosomas humanos microdisecados o fragmentos de ADN clonados, dependiendo del tipo de sonda.

Para resultados óptimos, se deben seleccionar conjuntos de filtros de microscopio compatible con la fluorescencia de las sondas.

Fluorocromo	Pico de excitación (nm)	Pico de emisión (nm)	Compatibilidad con otros tintes
CytoRed™	583	605	SpectrumRed Yoduro de propidio (543-614)

CytoOrange™	551	575	SpectrumOrange
CytoGold™	523	549	SpectrumGold
CytoGreen™	495	518	SpectrumGreen Isotiocianato de fluoresceina (FITC)
CytoAqua™	422	471	SpectrumAqua
CytoBlue™	402	421	SpectrumBlue (400-450)

Advertencias y precauciones

La exposición excesiva a la luz puede fotoblanquear los fluorocromos de la sonda. Por favor, tomar las precauciones apropiadas al manejar todos los reactivos y portaobjetos que contengan la sonda para evitar la exposición directa y prolongada a la luz. Se recomienda seguir las instrucciones descritas en estas Instrucciones de Uso al manipular y utilizar sondas FISH CytoTest.

Los operadores del experimento deberán utilizar vestimenta de protección apropiada, guantes y protección para los ojos/cara. Los reactivos utilizados en experimentos FISH podrían irritar los ojos y la piel; evitar el contacto con la piel y los ojos. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con abundante agua y consultar a un médico.

Manejo inadecuado durante el transporte o almacenamiento potencialmente puede degradar o deteriorar el rendimiento del producto. Cualquier producto comprometidas deben ser desechados de acuerdo con cualquier ley o reglamento en su institución, la región y / o país aplicables, y los reactivos no deben utilizarse en las pruebas. Si usted tiene alguna preocupación sobre la degradación de la calidad o el rendimiento del producto, póngase en contacto con el fabricante o con su distribuidor regional(s).

Almacenamiento y manipulación

Las sondas FISH CytoTest se deben almacenar a entre -15°C y -25°C en un lugar protegido de la luz. Evitar varios ciclos de congelamiento/descongelamiento. Por favor, verificar la fecha de vencimiento en la etiqueta del producto antes de usarlo. Las condiciones de almacenamiento y manipulación se aplican a productos tanto abiertos como cerrados.

Materiales proporcionados

Sonda FISH de ADN CytoTest proporcionadas en concentración lista para usar.

Equipo de laboratorio requerido pero no proporcionado

- Pipeta de microlitro (1 a 10 µL) y puntas limpias
- Tubos de microcentrífuga de polipropileno (0,5 mL o 1,5 mL)
- Cubreobjetos de vidrio de 22 mm x 22 mm
- Pegamento de caucho
- Cilindro graduado
- Punzón con punta de diamante
- Temporizador
- Fórceps
- Vasos coplin
- Frascos para medio (250 mL)
- Termómetro calibrado
- Agitador vórtex
- Microcentrífuga
- Baños de agua (37 ± 2°C, 72 ± 2°C, y 80 ± 2°C)
- Incubadora de aire forzado (37 ± 2°C)
- Calentador de portaobjetos
- Microscopio de luz de contraste de fases
- Microscopio fluorescente equipado con los filtros recomendados

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

(Las condiciones experimentales en este manual del usuario son recomendaciones generales y están sujetas a cambio, dependiendo de la condición del material de muestra. Es posible que se requieran ajustes para ciertos tipos de muestra.)

Procedimiento FISH para muestras FFPE

Reactivos necesarios pero no provistos

- Equipo de reactivos de tratamiento previo de parafina (Cat No: CT-ACC112-05):
 - Solución de tratamiento previo (50 ml): almacenar a temperatura ambiente (TA)
 - Tampón de proteasa (62,5 ml, pH 2,0): almacenar a TA
 - Proteasa (250 mg): Liofilizada, almacenar a -20°C
- Equipo de reactivos FISH (Cat No: CT-ACC101-20):
 - Tampón de cloruro de sodio y citrato de sodio (SSC) 20X Sal: almacenar a TA, evitar la humedad
 - Tinción de contraste 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI): almacenar a 4°C en un lugar oscuro
 - NP-40 (octilfenoxipolietoxietanol, o Nonidet P-40): almacenar a TA
- Xileno: almacenar a TA
- Etanol (100%): almacenar a TA
- Agua purificada: almacenar a TA
- (12N) HCl concentrado: almacenar a TA

Preparación de las soluciones de trabajo

1. Solución SSC 20X (pH 7.0)

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Sal SSC	66 g	20X
H ₂ O desionizada (dH ₂ O)	250 ml	
TOTAL	250 ml	

2. Solución de proteasa

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Proteasa, liofilizada	250 mg	4 mg/ml
Tampón de proteasa	62,5 ml	
TOTAL	62,5 ml	

3. Etanol al 90%

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Etanol (100%)	90 ml	90%
dH ₂ O	10 ml	
TOTAL	100 ml	

4. Etanol al 70%

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Etanol (100%)	70 ml	70%
dH ₂ O	30 ml	
TOTAL	100 ml	

5. Solución de lavado poshibridación (pH 7.0)

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
-----------	-------------------	---------------------

Solución SSC 20X	10 ml	2X
NP-40	300 µl	0,3%
dH ₂ O	90 ml	
TOTAL	100 ml	

Procedimiento FISH para secciones de tejido embebido en parafina

Tratamiento previo del portaobjetos

1. Sumergir los portaobjetos en xileno a TA durante 10 minutos. Repetir dos veces, cada una con xileno nuevo.
2. Deshidratar los portaobjetos en etanol al 100% a TA durante 5 minutos. Repetir una vez con etanol al 100% nuevo.
3. Secar al aire durante 2-5 minutos, si se desea.
4. Sumergir los portaobjetos en una solución de tratamiento previo precalentada a 80°C durante 10 minutos.
5. Sumergir los portaobjetos en agua purificada a TA durante 3 minutos.

Tratamiento previo de proteasa

1. Sumergir los portaobjetos en una solución de proteasa a 37°C durante 10-60 minutos (según el estado de las muestras) y controlar la condición de las células bajo un microscopio con luz.
2. Sumergir los portaobjetos en agua purificada a TA durante 3 minutos.
3. Secar al aire durante 2-5 minutos.

Deshidratación de los portaobjetos

1. Sumergir los portaobjetos en etanol al 70% durante 3 minutos.
2. Sumergir los portaobjetos en etanol al 90% durante 3 minutos.
3. Sumergir los portaobjetos en etanol al 100% durante 3 minutos.
4. Dejar secar al aire los portaobjetos.

Preparación de la sonda

1. Precalentar la sonda a TA durante 20-30 minutos.
2. Mezclar bien brevemente y centrifugar la sonda.

Codesnaturalización e hibridación

1. Aplicar 10 µl de la sonda en cada área de hibridación y cubrir con un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm. Sellar el cubreobjetos (o los cubreobjetos) con pegamento de caucho.
2. Codesnaturalizar los portaobjetos con la sonda a 72°C durante 5 minutos.
3. Colocar los portaobjetos en una cámara de hibridación humidificada y precalentada e incubar los portaobjetos a 37°C durante la noche (16 horas).

Lavado poshibridación

1. Marcar cada área de hibridación en la parte posterior de los portaobjetos con un lápiz con punta de diamante.
2. Retirar con cuidado el pegamento de caucho.
3. Sumergir los portaobjetos en solución de lavado poshibridación a TA para aflojar los cubreobjetos. Agitar levemente para permitir que los cubreobjetos se desprendan sin ayuda; no tirar de los cubreobjetos para retirarlos.
4. Sumergir los portaobjetos en una solución de lavado poshibridación precalentada a 72°C durante 2 minutos.

Deshidratación de los portaobjetos

1. Sumergir los portaobjetos en etanol al 70% durante 2 minutos.
2. Sumergir los portaobjetos en etanol al 90% durante 2 minutos.
3. Sumergir los portaobjetos en etanol al 100% durante 2 minutos.

4. Secar los portaobjetos al aire en un lugar oscuro.

Visualización

1. Aplicar tinción de contraste DAPI y cubrir los portaobjetos con un cubreobjetos.
2. Examinar los portaobjetos bajo un microscopio fluorescente con las configuraciones adecuadas de filtro.

Procedimiento FISH para muestras citológicas

Reactivos necesarios pero no provistos

- Equipo de reactivos FISH (Cat No: CT-ACC101-20):
 - Sal SSC 20X: almacenar a TA, evitar la humedad
 - Tinción de contraste DAPI: almacenar a 4°C en un lugar oscuro
 - NP-40: almacenar a TA
- Pepsina (liofilizada): almacenar a -20°C o una temperatura inferior
- Ácido clorhídrico (1N): almacenar a TA
- Formaldehído (37%): almacenar a TA
- Solución tampón fosfato salino (PBS) 10X: almacenar a TA
- Etanol (100%): almacenar a TA

Preparación de las soluciones de trabajo

1. Solución SSC 20X (pH 7.0)

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Sal SSC	66 g	20X
dH ₂ O	250 ml	
TOTAL	250 ml	

2. Solución madre de pepsina

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Pepsina, liofilizada	100 mg	100 mg/ml
dH ₂ O	1 ml	
TOTAL	1 ml	

Nota: Mantener sobre hielo. Realizar partes iguales de 20 µl, almacenar a -20°C.

3. Solución de trabajo de pepsina

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
HCl (1N)	1 ml	0,01N
Solución madre de pepsina	20 µl	0,02 µg/µl
dH ₂ O	99 ml	
TOTAL	100 ml	

4. Solución SSC 2X

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Solución SSC 20X	10 ml	2X
dH ₂ O	90 ml	
TOTAL	100 ml	

5. Solución PBS 1X

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
-----------	-------------------	---------------------

Solución PBS 10X	10 ml	1X
dH ₂ O	90 ml	
TOTAL	100 ml	

6. Solución de formaldehido

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Formaldehido (37%)	2,7 ml	1%
Solución PBS 10X	10 ml	1X
dH ₂ O	89 ml	
TOTAL	100 ml	

7. Etanol al 90%

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Etanol (100%)	90 ml	90%
dH ₂ O	10 ml	
TOTAL	100 ml	

8. Etanol al 70%

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Etanol (100%)	70 ml	70%
dH ₂ O	30 ml	
TOTAL	100 ml	

9. Solución de lavado poshibridación 1

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Solución SSC 20X	2 ml	0,4X
NP-40	300 µl	0,3%
dH ₂ O	98 ml	
TOTAL	100 ml	

10. Solución de lavado poshibridación 2

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Solución SSC 20X	10 ml	2X
NP-40	100 µl	0,1%
dH ₂ O	90 ml	
TOTAL	100 ml	

Procedimiento FISH para citología

Preparación de los portaobjetos

1. Equilibrar los portaobjetos en una solución SSC 2X a TA durante 2 minutos.
2. Sumergir los portaobjetos en una solución de trabajo de pepsina precalentada a 37°C durante 1-10 minutos (según el estado de las muestras) y controlar la condición de las células bajo un microscopio con luz.
3. Lavar los portaobjetos en solución PBS 1X a TA durante 5 minutos.
4. Posfijar los portaobjetos en una solución de formaldehido a TA durante 5 minutos.
5. Lavar los portaobjetos en solución PBS 1X a TA durante 5 minutos.

Deshidratación de los portaobjetos

1. Sumergir los portaobjetos en etanol al 70% durante 3 minutos.
2. Sumergir los portaobjetos en etanol al 90% durante 3 minutos.
3. Sumergir los portaobjetos en etanol al 100% durante 3 minutos.
4. Dejar secar al aire los portaobjetos.

Preparación de la sonda

1. Precalentar las sondas a TA durante 20~30 minutos.
2. Mezclar bien brevemente y centrifugar las sondas.

Codesnaturalización e hibridación

1. Aplicar 10 µl de la sonda en cada área de hibridación y cubrir con un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm. Sellar el cubreobjetos (o los cubreobjetos) con pegamento de caucho.
2. Codesnaturalizar los portaobjetos con la sonda a 72°C durante 2 minutos.
3. Colocar los portaobjetos en una cámara de hibridación humidificada y precalentada e incubar los portaobjetos a 37°C durante la noche (16 horas).

Lavado poshibridación

1. Marcar el área de hibridación en la parte posterior de los portaobjetos con un lápiz con punta de diamante.
2. Retirar con cuidado el pegamento de caucho.
3. Empapar el portaobjetos en una solución SSC 2X a TA para aflojar el cubreobjetos (o los cubreobjetos). No retirar el cubreobjetos (o los cubreobjetos).
4. Sumergir los portaobjetos en una solución de lavado poshibridación precalentada 1 a 72°C durante 1 minuto.
5. Sumergir los portaobjetos en una solución de lavado poshibridación 2 a TA durante 2 minutos.
6. Dejar secar al aire los portaobjetos.

Visualización

1. Aplicar tinción de contraste DAPI y cubrir con un cubreobjetos (o cubreobjetos).
2. Examinar los portaobjetos bajo un microscopio fluorescente con las configuraciones adecuadas de filtro.

Procedimiento FISH para muestras de líquido amniótico

Reactivos necesarios pero no provistos

- Equipo de reactivos FISH:
 - Sal SSC 20X: almacenar a TA, evitar la humedad
 - Tinción de contraste DAPI: almacenar a 4°C en un lugar oscuro
 - NP-40: almacenar a TA
- Pepsina (liofilizada): almacenar a -20°C o una temperatura inferior
- Ácido clorhídrico (1N): almacenar a TA
- Formaldehído (37%): almacenar a TA
- Solución PBS 10X: almacenar a TA
- Etanol (100%): almacenar a TA

Preparación de las soluciones de trabajo

1. Solución SSC 20X (pH 7.0)

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Sal SSC	66 g	20X
dH ₂ O	250 ml	
TOTAL	250 ml	

2. Solución madre de pepsina

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Pepsina, liofilizada	100 mg	100 mg/ml
dH ₂ O	1 ml	
TOTAL	1 ml	

Nota: Mantener sobre hielo. Realizar partes iguales de 20 µl, almacenar a -20°C.

3. Solución de trabajo de pepsina 1 (para muestras no cultivadas)

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
HCl (1N)	1 ml	0,01N
Solución madre de pepsina	50 µl	0,05 µg/µl
dH ₂ O	99 ml	
TOTAL	100 ml	

4. Solución de trabajo de pepsina 2 (para muestras cultivadas)

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
HCl (1N)	1 ml	0,01N
Solución madre de pepsina	20 µl	0,02 µg/µl
dH ₂ O	99 ml	
TOTAL	100 ml	

5. Solución SSC 2X

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Solución SSC 20X	10 ml	2X
dH ₂ O	90 ml	
TOTAL	100 ml	

6. Solución PBS 1X

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Solución PBS 10X	10 ml	1X
dH ₂ O	90 ml	
TOTAL	100 ml	

7. Solución de formaldehído

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Formaldehído (37%)	2,7 ml	1%
Solución PBS 10X	10 ml	1X
dH ₂ O	89 ml	
TOTAL	100 ml	

8. Etanol al 90%

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Etanol (100%)	90 ml	90%
dH ₂ O	10 ml	
TOTAL	100 ml	

9. Etanol al 70%

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Etanol (100%)	70 ml	70%
dH ₂ O	30 ml	
TOTAL	100 ml	

10. Solución de lavado poshibridación 1

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Solución SSC 20X	2 ml	0,4X
NP-40	300 µl	0,3%
dH ₂ O	98 ml	
TOTAL	100 ml	

11. Solución de lavado poshibridación 2

Reactivos	Cantidad agregada	Concentración final
Solución SSC 20X	10 ml	2X
NP-40	100 µl	0,1%
dH ₂ O	90 ml	
TOTAL	100 ml	

Procedimiento FISH para amniocitos

Preparación de los portaobjetos

Muestras no cultivadas:

1. Equilibrar los portaobjetos en una solución SSC 2X a 37°C durante 1 hora.
2. Sumergir los portaobjetos en una solución de trabajo de pepsina 1 precalentada a 37°C durante 1-10 minutos (según el estado de las muestras) y controlar la condición de las células bajo un microscopio con luz.
3. Lavar los portaobjetos en solución PBS 1X a TA durante 5 minutos.
4. Posfijar los portaobjetos en una solución de formaldehído a TA durante 5 minutos.
5. Lavar los portaobjetos en solución PBS 1X a TA durante 5 minutos.

Muestras cultivadas:

1. Equilibrar los portaobjetos en una solución SSC 2X a TA durante 2 minutos.
2. Sumergir los portaobjetos en una solución de trabajo de pepsina 2 precalentada a 37°C durante 1-10 minutos (según el estado de las muestras) y controlar la condición de las células bajo un microscopio con luz.
3. Lavar los portaobjetos en solución PBS 1X a TA durante 5 minutos.
4. Posfijar los portaobjetos en una solución de formaldehído a TA durante 5 minutos.
5. Lavar los portaobjetos en solución PBS 1X a TA durante 5 minutos.

Deshidratación de los portaobjetos

1. Sumergir los portaobjetos en etanol al 70% durante 3 minutos.
2. Sumergir los portaobjetos en etanol al 90% durante 3 minutos.
3. Sumergir los portaobjetos en etanol al 100% durante 3 minutos.
4. Dejar secar al aire los portaobjetos.

Preparación de la sonda

1. Precalentar las sondas a TA durante 20~30 minutos.
2. Mezclar bien brevemente y centrifugar las sondas.

Codesnaturalización e hibridación

1. Aplicar 10 µl de la sonda en cada área de hibridación y cubrir con un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm. Sellar el cubreobjetos (o los cubreobjetos) con pegamento de caucho.
2. Codesnaturalizar los portaobjetos con la sonda a 72°C durante 2 minutos.
3. Colocar los portaobjetos en una cámara de hibridación humidificada y precalentada e incubar los portaobjetos a 37°C durante la noche (16 horas).

Lavado poshibridación

1. Marcar las áreas de hibridación en la parte posterior de los portaobjetos con un lápiz con punta de diamante.
2. Retirar con cuidado el pegamento de caucho.
3. Empapar el portaobjetos en una solución SSC 2X a TA para aflojar el cubreobjetos (o los cubreobjetos). No retirar el cubreobjetos (o los cubreobjetos).
4. Sumergir los portaobjetos en una solución de lavado poshibridación precalentada 1 a 72°C durante 1 minuto.
5. Sumergir los portaobjetos en una solución de lavado poshibridación 2 a TA durante 2 minutos.
6. Dejar secar al aire los portaobjetos.

Visualización

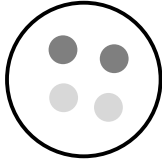
1. Aplicar tinción de contraste DAPI y cubrir con un cubreobjetos (o cubreobjetos).
2. Examinar los portaobjetos bajo un microscopio fluorescente con las configuraciones adecuadas de filtro.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Patrones de señales para sondas de amplificación/eliminación

Patrones normales

- 2 señales naranja + 2 señales verdes (2O2G)



Guía de colores

- Las señales naranja son representadas por puntos de color gris oscuro
- Las señales verdes son representadas por puntos de color gris claro

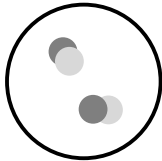
Patrones anormales

- Cualquier otro patrón

Patrones de señales para sondas de separación

Patrones normales

- 2 Señales naranja-verde superpuestas (2OG)



Guía de colores

- Las señales naranja son representadas por puntos de color gris oscuro
- Las señales verdes son representadas por puntos de color gris claro
- Las señales naranja y verde superpuestas pueden aparecer como amarillas.

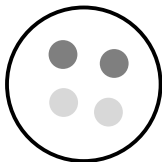
Patrones anormales

- Cualquier otro patrón

Patrones de señales para sondas de fusión/translocación

Patrones normales

- 2 señales naranja + 2 señales verdes (2O2G)



Guía de colores

- Las señales naranja son representadas por puntos de color gris oscuro
- Las señales verdes son representadas por puntos de color gris claro

Patrones anormales

- Cualquier otro patrón. Las señales fusionadas (naranja y verde superpuestas) pueden aparecer como señales amarillas.

REFERENCIAS

1. Andersson S, et al. *Am J Pathol.* 175(5): 1831–1847 (2009).
2. Blackburn EH. *Nature.* 350(6319):569-73 (1991).
3. Cairns P, et al. *Cancer Res.* 57(22):4997-5000 (1997).
4. Chiarle R, et al. *Nat Rev Cancer.* 8(1):11-23 (2008).
5. Chu EC & Tarnawski AS. *Med Sci Monit.* 10(10):RA235-41 (2004).
6. Coussens L, et al. *Science.* 230(4730):1132-9 (1985).
7. Djulbegovic M, et al. *BMJ.* 341:c4543 (2010).
8. Druker BJ, et al. *N Engl J Med.* 355(23):2408-17 (2006).
9. Ernst T, et al. *Hematol Oncol Clin North Am.* 25(5):997-1008, v-vi (2011).
10. Foulkes WD, et al. *Mol Med.* 3(1):5-20 (1997).
11. Gonzalez S, et al. *Nature.* 440(7084):702-6 (2006).
12. Heselmeyer K, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(1):479-84 (1996).
13. Heselmeyer-Haddad K, et al. *Cancer Res.* 62(8):2365-9 (2002).
14. Heselmeyer-Haddad K, et al. *Am J Pathol.* 166(4): 1229-1238 (2005).
15. Kamb A, et al. *Science.* 264(5157):436-40 (1994).
16. Kwak EL, et al. *N Engl J Med.* 363(18):1693-703 (2010).
17. Krimpenfort P, et al. *Nature.* 413(6851):83-6 (2001).
18. Landstrom AP & Tefferi A. *Leuk Lymphoma.* 47(3):397-402 (2006).
19. Minoo P & Wang HY. *Int J Clin Exp Pathol.* 5(5):397-410 (2012).
20. Nowell PC, Hungerford DA. *J Natl Cancer Inst.* 25:85-109 (1960).
21. Pathmanathan N & Bilous AM. *Pathology.* 44(7):587-95 (2012).
22. Pauletti G, et al. *J Clin Oncol.* 18(21):3651-64 (2000).
23. Rowley JD. *Nature.* 243(5405):290-3 (1973).
24. Salido M, et al. *J Thorac Oncol.* 6(1):21-7 (2011).
25. Sasaki T, et al. *Eur J Cancer.* 46(10):1773-80 (2010).
26. Sharpless E & Chin L. *Oncogene.* 22(20):3092-8 (2003).
27. Shay JW & Bacchetti S. *Eur J Cancer.* 33(5):787-91 (1997).
28. Slamon DJ, et al. *Science.* 235(4785):177-82 (1987).
29. Steck PA, et al. *Nat Genet.* 1997 Apr;15(4):356-62 (1997).
30. Yoshimoto M, et al. *Br J Cancer.* 97(5):678-685 (2007).

Fabricante



CytoTest Inc.
9430 Key West
Suite 210
Rockville, MD 20850
USA

Tel: +1-202-688-1188
Fax: +1-301-296-6950
Correo electrónico:
sales@cytotest.com

Representante autorizado en la Comunidad Europea



Obelis S.A.
Bd. General Wahis 53
1030 Brussels
Belgium

Tel: +32-2-732-59-54
Fax: +32-2-732-60-03
Correo electrónico:
mail@obelis.net

Copyright © 2015 CytoTest, Inc.
Todos los derechos reservados.
www.cytotest.com