ZytoMation
BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe

REF Z-2306-5.1ML Bis zu 20 (5,1 ml)

Für den qualitativen Nachweis von Translokationen des humanen MAML2-Gens bei 11q21 mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) auf automatisierten Bond-Systemen

4250380P392RK

CE 0483

IVD

In-vitro-Diagnostikum

gemäß IVDR (EU) 2017/746

1. Verwendungszweck

Die *ZytoMation* BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe (**PL260**) ist für den qualitativen Nachweis von Translokationen des humanen BCL2-Gens bei 18q21.33 in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben, wie z. B. B-Zell-Lymphomen, durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) bestimmt. Die Sonde ist für die Verwendung in Kombination mit dem Bond FISH Kit (DS9636) auf dem automatisierten Bond-MAX- oder Bond III-System von Leica Biosystems vorgesehen.

Das Produkt ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Alle Tests, bei denen das Produkt verwendet wird, sollten in einem zertifizierten, zugelassenen anatomisch-pathologischen Labor unter der Aufsicht eines Pathologen/Humangenetikers von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

Die Sonde ist als Hilfsmittel für die Differentialdiagnose von B-Zell-Lymphomen vorgesehen, und therapeutische Maßnahmen sollten nicht allein auf der Grundlage des Testergebnisses eingeleitet werden.

2. Prinzip der Methode

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente, sogenannte FISH-Sonden, und deren komplementäre Zielsequenzen in den Präparationen werden co-denaturiert und können anschließend während der Hybridisierung binden. Danach werden unspezifische und ungebundene Sondenfragmente durch Stringenzwaschschritte entfernt. Nach der Gegenfärbung der DNA mit DAPI werden hybridisierte Sondenfragmente mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert, welches mit für die Fluorochrome spezifischen Anregungs- und Emissionsfiltern ausgestattet ist, mit denen die FISH-Sondenfragmente direkt markiert wurden.

3. Enthaltene Reagenzien

Die *ZytoMation* BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe besteht aus:

- ZyGreen (Anregung 503 nm/Emission 528 nm) markierten Polynukleotiden (~6,0 ng/µl), die gegen Sequenzen in 18q21.33* (chr18:60,046,152-60,589,273) gerichtet sind, welche proximal zur BCL2-Bruchpunktregion lokalisiert sind (siehe Abb. 1).
- ZyOrange (Anregung 547 nm/Emission 572 nm) markierten Polynukleotiden (~2,5 ng/µl), die gegen Sequenzen in 18q21.33-q22.1* (chr18:60,994,528-61,658,503) gerichtet sind, welche distal zur BCL2-Bruchpunktregion lokalisiert sind (siehe Abb. 1).
- Hybridisierungsbuffer auf Basis von Formamid

*nach Human Genome Assembly GRCh37/hg19

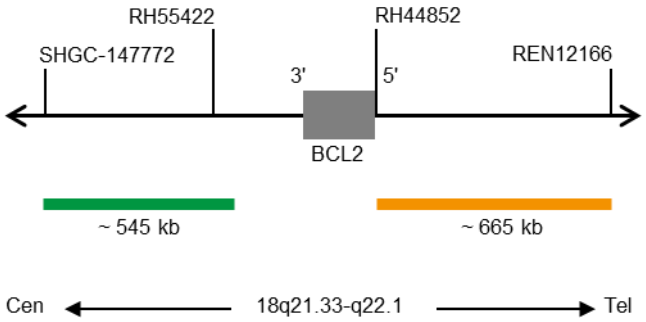

Abb. 1: BCL2 Sondenlokalisation (nicht maßstabsgetreu)

Die *ZytoMation* BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe ist verfügbar in einer Größe:

- Z-2292-5.1ML: 5,1 ml (bis zu 20 Reaktionen von je 240 µl)

4. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- Bond-MAX oder Bond-III system von Leica Biosystems
- Bond FISH Kit (DS9636)
- Bond Epitope Retrieval Solution 2 (AR9640)
- Bond Enzyme Pretreatment Kit (AR9551)
- DAPI/DuraTect-Solution (MT-0007-0.8)
- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Verstellbare Pipetten (20 µl, 1000 µl)
- Küvetten oder Färbetröge
- Stoppuhr
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (24 mm x 50 mm)
- Regelmäßig gewartetes Fluoreszenzmikroskop (400-1000x)
- Immersionsöl, geeignet für Fluoreszenzmikroskopie
- Entsprechende Filtersätze

Für weitere Informationen zu den benötigten, aber nicht bereitgestellten Materialien bitte die Gebrauchsanweisung des entsprechenden vollautomatischen Färbesystems beachten.

5. Lagerung und Handhabung

Bei 2-8°C in aufrechter Position und lichtgeschützt lagern. Vor Licht geschützt verwenden. Vor dem Öffnen Flüssigkeit herunterschütteln. Unmittelbar nach Gebrauch wieder unter Lagerbedingungen aufbewahren. Keine Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums verwenden. Das Produkt ist bei sachgemäßer Handhabung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

6. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Die Sonde nicht bei manuellen FISH-Anwendungen verwenden!
- Dieses Produkt enthält Substanzen (in geringen Konzentrationen und Volumina), welche gesundheitsschädlich und potentiell infektiös sind. Jeder direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen (Verwendung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung) sind zu ergreifen!

- Schwerwiegende Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften dem Hersteller sowie den zuständigen Behörden zu melden!
- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!
- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage für den beruflichen Anwender verfügbar.
- Die Reagenzien nicht wiederverwenden.
- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Sonde sollte nicht für längere Zeit dem Licht, insbesondere intensivem Licht, ausgesetzt werden. Das bedeutet, falls möglich sollten alle Arbeitsschritte im Dunkeln und/oder unter Verwendung von lichtundurchlässigen Behältnissen durchgeführt werden!

Gefahren- und Sicherheitshinweise:

Die gefahrbestimmende Komponente ist Formamid.

Gefahr

H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
H360FD	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.

7. Einschränkungen

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Nur zur Verwendung mit dem vollautomatischen Bond-MAX oder Bond III-System (Leica).
- Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung bzw. deren Abwesenheit muss im Kontext mit der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests erfolgen. Es obliegt der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit FISH Sonden, Reagenzien, Diagnose-Panels und den zur Erstellung von gefärbten Präparaten verwendeten Methoden vertraut zu sein. Die Färbung ist in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen durchzuführen, der für die Auswertung der Färbepräparate und für die Sicherstellung der Eignung von positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.
- Die Färbung der Präparate, insbesondere die Signalintensität und die Hintergrundfärbung, ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung der Präparate vor der Färbung. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Präparaten oder Flüssigkeiten können Artefakte oder falsche Ergebnisse verursachen. Inkonsistente Ergebnisse können von Variationen bei Fixierungs- und Einbettungsverfahren sowie von inhärenten Unregelmäßigkeiten innerhalb des Präparates resultieren.
- Die Sonde ist nur für den Nachweis der Loci, die in Kapitel 3 „Enthaltene Reagenzien" beschrieben werden, zu verwenden.
- Die Leistung wurde unter Verwendung des voll-automatisierten Bond-MAX System (Leica) und der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden. Dieses IVD ist nur dann CE-zertifiziert, wenn es wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben im Rahmen der bestimmungsgemäßen Verwendung eingesetzt wird.

8. Störsubstanzen

Rote Blutzellen innerhalb des Präparates können Autofluoreszenz verursachen, welche die Signalerkennung behindert.

Folgende Fixierungen sind nicht kompatibel mit FISH:

- Bouin Fixierung
- B5 Fixierung
- Saure Fixiermittel (z.B. Pikrinsäure)
- Zenker Fixierung
- Alkohole (bei alleiniger Verwendung)
- Quecksilberchlorid
- Formaldehyd/Zink Fixiermittel
- Hollande Fixierung
- Ungepuffertes Formalin

9. Vorbereitung der Präparate

Empfehlungen:

- Fixierung in 10% neutral gepuffertem Formalin für 24h bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Probengröße < 0,5 cm^3.
- Qualitativ hochwertiges Paraffin verwenden.
- Das Einbetten sollte bei Temperaturen unter 65°C erfolgen.
- 2-4 μm dicke Mikrotomschnitte anfertigen.
- Positiv geladene Objektträger verwenden.
- Für 2-16h bei 50-60°C fixieren.

10. Vorbereitung der Reagenzien

Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig. Die Sonde vor der Anwendung lichtgeschützt auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Vor dem Öffnen durch Vortexen mischen und kurz herunterschütteln.

11. Testverfahren

Die ZytoMation BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe ist für die Verwendung mit dem vollautomatischen Bond-MAX oder Bond III-System in Kombination mit den entsprechenden FISH Kits und FISH Protokollen vorgesehen. Für weitere Informationen bitte die entsprechende Gebrauchsanweisung des Systems beachten.

11.1 Slide Setup auf dem vollautomatischem Bond-MAX oder Bond-III system

Stellen Sie die folgenden Protokollschritte im Menü Slide-Setup ein:

Färbung:	*FISH Protocol D
Vorbereitung:	*Dewax
HIER:	set up as described in step 1 below
Enzyme:	set up as described in step 2 below
Denaturierung:	*Denaturation (10min)
Hybridisierung:	*ISH Hybridization (12Hr)

Vorbehandlung der Präparate

Die Präparatevorbehandlung (Entparaffinierung, Proteolyse) ist wie in der entsprechenden Gebrauchsanweisung des vollautomatischen Färbesystems beschrieben durchzuführen.

Je nach Präparat können Anpassungen des Protokolls notwendig sein. Die Validierung von Protokollen, welche vom empfohlenen Protokoll abweichen, muss vom Anwender durchgeführt werden.

1. Die Präparate mit der Bond Epitope Retrieval Solution 2 für 25 min bei 100°C vorbehandeln.

Für das HIER-Protokoll ein neues Protokoll erstellen, wie in der entsprechenden Gebrauchsanleitung des automatisierten Bond-MAX/Bond III-Systems beschrieben. Das Protokoll für den Protokollschritt "HIER" wählen.

2. Die Präparate mit der BOND Enzyme Dilution bei 37°C vorbehandeln.

Für den enzymatischen Verdau ein Protokoll nach den vom Anwender vorvalidierten Bedingungen abhängig vom Präparat sowie den nachfolgend beschriebenen Bedingungen zur Denaturierung und Hybridisierung auswählen. Das Protokoll für den Protokollschritt "Enzyme" auswählen.

Denaturierung und Hybridisierung

1. Die Denaturierung der Präparate auf 10 min bei 95°C einstellen.

   *Das voreingestellte Protokoll „*Denaturation (10min)" für den Protokollschritt „Denaturation" einstellen.*

2. Die Hybridisierung der Präparate auf 12 h bei 37°C einstellen.

   *Das voreingestellte Protokoll „*ISH Hybridization (12Hr)" für den Protokollschritt „Hybridization" einstellen.*

11.2 Färbevorgang

1. Die Objektträger, die FISH Sonde, die Enzymverdünnung und das Bond FISH Kit wie in der Gebrauchsanweisung beschrieben auf das System laden.
2. Wenn der Färbedurchgang beendet ist, die Objektträger aus dem Instrument herausholen. Die Objektträger vor Licht schützen.

11.3 Post-Hybridisierung und Detektion

1. Dehydrierung für jeweils 1 min in 70%, 90% und 100% Ethanol.
2. Schnitte vor Licht geschützt an der Luft trocknen.
3. 20 µl DAPI/DuraTect-Solution (**MT7**) auf die Objektträger pipettieren. Die Präparate mit einem Deckglas (24 mm x 50 mm) abdecken, dabei den Einschluss von Luftbläschen vermeiden.

Die Verwendung einer abgeschnittenen Pipettenspitze zur Vergrößerung der Öffnung kann das Pipettieren erleichtern. Nicht lange dem Licht aussetzen.

4. Die Objektträger im Dunkeln aufbewahren. Bei längerer Lagerung sollte dies bei 2-8°C erfolgen.
5. Die Auswertung des Probenmaterials erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie.

12. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung von geeigneten Filtersätzen erscheinen die Hybridisierungssignale der Sonde grün (proximal zur BCL2-Bruchpunktregion) und orange (distal zur BCL2-Bruchpunktregion).

Normale Situation: In Interphasen von normalen Zellen oder Zellen ohne eine Translokation der BCL2-Genregion erscheinen zwei grün/orange Fusionssignale (siehe Abb. 2).

Aberrante Situation: Eine von einer Translokation betroffene BCL2-Genregion wird durch ein separates grünes Signal und ein separates oranges Signal gekennzeichnet (siehe Abb. 2).

Sich überlagernde Signale können als gelbe Signale erscheinen.

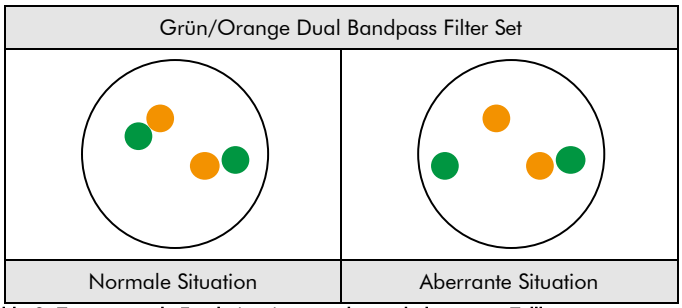

Abb. 2: Zu erwartende Ergebnisse in normalen und aberranten Zellkernen

Genomische Aberrationen aufgrund kleinerer Deletionen, Duplikationen oder Inversionen können zu unauffälligen Signalmustern führen.Bei einigen aberranten Präparaten können andere Signalmuster als die oben beschriebenen beobachtet werden. Diese unerwarteten Signalmuster sollten weiter untersucht werden.

Bitte beachten:

- Aufgrund von dekondensiertem Chromatin können einzelne FISH-Signale als kleine Signal-Cluster erscheinen. Daher sollten zwei oder drei Signale der gleichen Größe mit einer Distanz von ≤ 1 Signaldurchmesser als ein Signal gewertet werden.
- Sich überlagernde Zellkerne nicht auswerten.
- Über-verdaute Zellkerne nicht auswerten (erkennbar als dunkle Areale im Zellkern).
- Keine Auswertung von Zellen mit starker Eigenfluoreszenz, welche die Signalerkennung behindert.
- Ein negatives oder unspezifisches Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht warden (siehe Kapitel 16 "Fehlerbehebung")
- Um die Ergebnisse korrekt zu interpretieren, muss der Anwender das Produkt vor der Anwendung in diagnostischen Verfahren unter Berücksichtigung nationaler und/oder internationaler Richtlinien validieren.

13. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

Um die korrekte Leistung der verwendeten Präparate und Testreagenzien zu überwachen, sollte jeder Test von internen und externen Kontrollen begleitet werden. Falls interne und/oder externe Kontrollen keine adäquate Färbung zeigen, müssen die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig angesehen werden.

Interne Kontrolle: Nicht-neoplastische Zellen innerhalb des Präparates, die ein normales Signalmuster aufweisen, z.B. Fibroblasten.

Externe Kontrolle: Validierte positive und negative Kontrollproben.

14. Leistungsmerkmale

14.1 Analytische Leistung

Die Leistung der Sonde wurde durch den Vergleich mit der entsprechenden IVD-zugelassenen FISH-Sonde bestimmt.

Analytische Sensitivität:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analytische Spezifität:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

Die Tag-zu-Tag-Reproduzierbarkeit wurde getestet, indem die von einem Prüfer an 10 verschiedenen Tagen erzielten Ergebnisse verglichen und die Übereinstimmung bewertet wurde.

	Prozentuale Übereinstimmung
Negative Präparate	100%
Positive Präparate	100%

Die Wiederholbarkeit wurde getestet, indem die von einem Prüfer an 10 verschiedenen Tagen erzielten Ergebnisse verglichen und die Übereinstimmung bewertet wurde.

	Prozentuale Übereinstimmung
Negative Präparate	100%
Positive Präparate	100%

14.2 Klinische Leistung

Diagnostische Sensitivität:	100% (95% CI 98.0 – 100.0) vs. FlexISH BCL2/BCL6 DistinguISH Probe
Diagnostische Spezifität:	100% (95% CI 98.0 – 100.0) vs. FlexISH BCL2/BCL6 DistinguISH Probe

15. Entsorgung

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

16. Fehlerbehebung

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu schwachen bis gar keinen Färbungen führen. Weitere Informationen erhalten Sie unter www.zytovision.com.

Schwache oder keine Signale

Mögliche Ursache	Lösung
Zell- oder Gewebeproben sind nicht korrekt fixiert	Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal	Die Inkubationszeit mit Enzym optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren

Ungeeignete Filtersätze verwendet	Für die Fluorochrome der Sonde geeignete Filtersätze verwenden. *Triple-Bandpass-Filtersätze liefern im Vergleich zu Single- oder Dual-Bandpass-Filtersätzen weniger Licht. Daher können die Signale unter Verwendung von Triple-Bandpass-Filtersätzen schwächer erscheinen.*

Kreuzhybridisierungssignale, Hintergrundsignale

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Die Inkubationszeit mit Enzym reduzieren

Degradierte Morphologie

Mögliche Ursache	Lösung
Zell- oder Gewebeproben sind nicht optimal fixiert	Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal ausgeführt	Die Inkubationszeit mit Enzym optimieren, falls notwendig reduzieren
Hitze-Vorbehandlung nicht optimal durchgeführt	Hitze-Vorbehandlung optimieren

Überlagernde Zellkerne

Mögliche Ursache	Lösung
Ungeeignete Dicke der Gewebeschnitte	2-4 µm dicke Mikrotomschnitte anfertigen

Präparat löst sich vom Objektträger

Mögliche Ursache	Lösung
Unzureichende Trocknung des Präparats	Die Dauer der Lufttrocknung vor der Färbung anpassen
Fixierung in nicht korrekt neutral gepuffertem Formalin	Geeignetes neutral gepuffertes Formalin mit guter Qualität verwenden

Schwache Gegenfärbung

Mögliche Ursache	Lösung
Gering konzentrierte DAPI-Lösung	DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. Nr. MT-0008-0.8) stattdessen verwenden
Inkubationszeit mit DAPI zu kurz	Inkubationszeit mit DAPI anpassen

17. Literatur

- Marino F, et al. (2021) *Virchows Archiv 479*: 565-573.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet 53*: 134-6.
- Willenbacher E, et al. (2020) *Annals of Hematology 99*: 2123-2132.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revision

Revision	Beschreibung der Änderung
4.1.1	Änderung der Benanntenstelle 14. Leistungsmerkmale Genauigkeit hinzugefügt
4.2.1	BCL2 Sondenlokalisation upgedatet

www.zytovision.com

Die aktuellste Gebrauchsanweisung sowie Gebrauchsanweisungen in verschiedenen Sprachen finden Sie unter www.zytovision.com.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.
Bitte kontaktieren Sie helptech@zytovision.com
Einen Kurzbericht über Sicherheit und Leistung finden Sie unter www.zytovision.com..

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Germany
Telefon: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Warenzeichen:
ZytoVision® und ZytoMation® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.