ZytoVision

*Zyto*Mation

BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe

REF Z-2306-5.1ML Σ Jusqu'à 20 (5.1 ml)

Pour la détection qualitative des translocations impliquant le gène humain BCL2 en 18q21.33 par hybridation *in situ en* fluorescence (FISH) sur les systèmes automatisés Bond

4250380P392RK

CE 0124

IVD

Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

conformément à l'IVDR (UE) 2017/746

1. Utilisation prévue

La sonde *Zyto*Mation BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe (**PL260**) est destinée à la détection qualitative des translocations impliquant le gène humain BCL2 en 18q21.33 dans les échantillons fixés au formol et inclus en paraffine, tels que les lymphomes à cellules B, par hybridation fluorescente in situ (FISH). La sonde est destinée à être utilisée en combinaison avec le Bond FISH Kit (DS9636) sur le système automatisé Bond-MAX ou Bond III de Leica Biosystems.

Le produit est destiné à un usage professionnel uniquement. Tous les tests utilisant le produit doivent être réalisés dans un laboratoire d'anatomie pathologique certifié et agréé, sous la supervision d'un médecin pathologiste/généticien , par du personnel qualifié.

La sonde est destinée à être utilisée comme une aide au diagnostic différentiel des lymphomes à cellules B et des mesures thérapeutiques ne doivent pas être prises sur la base du seul résultat du test.

2. Principe du test

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acide nucléique spécifiques dans une préparation cellulaire. Les fragments d'ADN marqués par fluorescence, appelés sondes FISH, et leurs brins d'ADN complémentaires dans les échantillons sont dénaturés et puis ré-appariés pendant l'hybridation. Par la suite, les fragments de sonde non spécifiques et non hybridés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. Après une contre coloration de l'ADN avec du DAPI, les fragments de sondes hybridés sont visualisés au moyen d'un microscope à fluorescence équipé de filtres d'excitation et d'émission spécifiques aux fluorochromes avec lesquels les fragments de sondes FISH ont été marqués.

3. Réactifs inclus

*Zyto*Mation BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe est composé de:

- Polynucléotides marqués au ZyGreen (excitation 503 nm/émission 528 nm) (~6,0 ng/µl), qui ciblent des séquences cartographiées en 18q21.33* (chr18:60,046,152-60,589,273) à proximité de la région du point de rupture BCL2 (voir figure 1).
- Polynucléotides marqués au ZyOrange (excitation 547 nm/émission 572 nm) (~2,5 ng/µl), qui ciblent des séquences cartographiées en 18q21.33-q22.1* (chr18:60,994,528-61,658,503) distales de la région du point de rupture BCL2 (voir figure 1).
- Tampon d'hybridation à base de formol

* selon Human Genome Assembly GRCh37/hg19

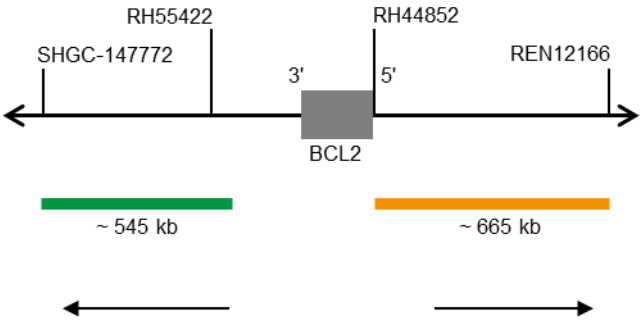

Fig. 1 : Carte de la sonde BCL2 (pas à l'échelle)

*Zyto*Mation BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe est disponible en une seule taille:

- Z-2306-5.1ML: 5.1 ml (jusqu'à 20 réactions de 240 µl chacune)

4. Matériel requis mais non fourni

- Système Bond-MAX ou Bond-III de Leica Biosystems
- Bond FISH Kit (DS9636)
- Bond Epitope Retrieval Solution 2 (AR9640)
- Bond Enzyme Pretreatment Kit (AR9551)
- DAPI/DuraTect-Solution (MT-0007-0.8)
- Bond Universal Covertiles (S21.4611)
- Bond Titration Kit (OPT9049)
- Dewax Solution (AR9222)
- Bond Wash Solution 10X Concentrate (AR9590)
- Echantillons de contrôle positif et négatif
- Lames de microscope, chargées positivement
- Pipettes réglables (25 µl, 1000 µl)
- Bocaux ou bacs de coloration
- Minuteur
- Éthanol ou alcool réactif
- Eau désionisée ou distillée
- Couvre-objets (24 mm x 60 mm)
- Microscope à fluorescence convenablement entretenu (400-1000x)
- Huile d'immersion approuvée pour la microscopie à fluorescence
- Jeux de filtres appropriés

Pour de plus amples informations sur le matériel requis mais non fourni, veuillez vous référer au mode d'emploi du système de marquage entièrement automatisé correspondant.

5. Stockage et manipulation

Conserver entre 2 et 8 °C dans une position verticale et à l'abri de la lumière. Utiliser à l'abri de la lumière. Avant d'ouvrir le flacon, agitez le liquide. Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le produit est stable jusqu'à sa date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est utilisé dans les bonnes conditions.

6. Avertissements et précautions

- Lire les instructions avant utilisation !
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- La sonde ne doit pas être utilisée dans les procédures FISH manuelles !

- Ce produit contient des substances (en faibles concentrations et volumes) nocifs pour la santé et potentiellement infectieux. Eviter le contact direct avec ces réactifs. Prenez les mesures de protection appropriées (utilisez des gants jetables, des lunettes de protection et des vêtements de laboratoire) !
- Signaler tout incident grave survenu en rapport avec le produit au fabricant et à l'autorité compétente, conformément à la réglementation locale!
- Si les réactifs entrent en contact avec la peau, rincer immédiatement avec beaucoup d'eau.
- Une fiche signalétique de sécurité à l'usage de l'utilisateur professionnel est disponible sur demande.
- Ne pas réutiliser les réactifs, sauf si la réutilisation est explicitement autorisée!
- Éviter la contamination croisée des échantillons car cela peut entraîner des résultats erronés.
- La sonde ne doit pas être exposée à la lumière, en particulier à une lumière intense, pendant une longue période ; chaque étape doit être faite, si possible, dans l'obscurité et/ou en utilisant des récipients opaques.

Mentions de danger et conseils de prudence :

Le composant dangereux déterminant est le formol.

Danger

H351	Susceptible de provoquer le cancer.
H360FD	Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus.
H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
P201	Se procurer les instructions spéciales avant utilisation.
P202	Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
P260	Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/ brouillards/vapeurs/aérosols.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P308+P313	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.
P405	Garder sous clef.

7. Restrictions

- Destiné à une utilisation en diagnostic *in vitro*.
- Destiné à un usage professionnel uniquement.
- A utiliser uniquement avec le système entièrement automatisé Bond-MAX ou Bond-III (Leica).
- L'interprétation clinique de tout marquage positif, ou de son absence, doit être faite en tenant compte de l'historique clinique du patient, de la morphologie, d'autres critères histopathologiques ainsi que d'autres tests diagnostiques. Il est de la responsabilité d'un médecin pathologiste/généticien qualifié de se familiariser avec les sondes FISH, les réactifs, les panels de diagnostic et les méthodes utilisées pour produire la préparation marquée. Le marquage doit être effectuée dans un laboratoire certifié et agréé sous la supervision d'un pathologiste/généticien qui est responsable de l'examen des lames marquées et de la vérification de l'adéquation des contrôles positifs et négatifs.
- Le marquage de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et le bruit de fond, dépend de la manipulation et de la préparation de l'échantillon avant marquage. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, un mauvais lavage, séchage, chauffage, de mauvaises coupes, ou une contamination avec d'autres échantillons ou fluides peut produire des artéfacts et de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter des variations des méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités inhérentes à l'échantillon.
- La sonde doit être utilisée uniquement pour la détection du locus décrit au paragraphe 3. « Réactifs fournis ».
- Les performances ont été validées en utilisant le système Bond-MAX (Leica) entièrement automatisé et les procédures décrites dans ce mode d'emploi. Des modifications de ces procédures peuvent altérer la performance comme CE-IVD et doivent être validées par l'utilisateur. Ce réactif IVD est uniquement certifié CE lorsqu'il est utilisé comme décrit dans ce mode d'emploi dans le cadre de l'utilisation prévue.

8. Substances interférentes

Les globules rouges présents dans l'échantillon peuvent présenter une autofluorescence qui entrave la reconnaissance du signal.

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec la FISH :

- Fixateur de Bouin
- Fixateur B5
- Fixateurs acides (par exemple l'acide picrique)
- Fixateur de Zenker
- Alcools (lorsqu'ils sont utilisés seuls)
- Chlorure de mercure
- Fixateur formaldéhyde/zinc
- Fixateur de Hollande
- Formol non tamponné

9. Préparation des échantillons

Recommandations:

- Fixation dans 10 % de formol tamponné pendant 24 h à température ambiante (18 à 25 °C)
- Taille de l'échantillon ≤ 0,5 cm^3.
- Utiliser de la paraffine de bonne qualité
- L'inclusion doit être faite à une température inférieure à 65 °C.
- Préparer des sections de 2-4 μm.
- Utiliser des lames pour microscope chargées positivement
- Fixer pendant 2 à 16 h à 50-60 %.

10. Traitement préparatoire du produit

Le produit est prêt à l'emploi. Il n'est pas nécessaire de le reconstituer, le mélanger ou le diluer. Mettre la sonde à température ambiante (18 à 25 °C) avant utilisation, à l'abri de la lumière. Avant d'ouvrir le flacon, mélangez par vortex et secouez brièvement.

11. Protocole

La sonde Zyto*Mation* BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe est destiné à être utilisée sur le système entièrement automatisé Bond-MAX ou Bond-III en combinaison avec les kits FISH et les protocoles FISH respectifs. Veuillez vous référer au mode d'emploi du système utilisé pour plus d'informations.

11.1 Mise en place des diapositives sur le système Bond-MAX ou Bond-III entièrement automatisé

Définissez les étapes suivantes du protocole dans le menu de configuration de la lame :

Marquage :	*Protocole FISH D
Préparation :	*Dewax
HIER :	configuré comme décrit à l'étape 1 ci-dessous
Enzyme :	configuré comme décrit à l'étape 2 ci-dessous
Dénaturation :	*Dénaturation (10min)
Hybridation :	*Hybridation ISH (12Hr)

Prétraitement des échantillons

Effectuer le prétraitement des échantillons (déparaffinage, protéolyse, HIER) conformément aux instructions d'utilisation du système de marquage entièrement automatisé.

En fonction de l'échantillon, il peut être nécessaire d'adapter le protocole. Une validation des protocoles s'écartant des protocoles recommandés doit être effectuée par l'utilisateur.

1. Prétraiter les échantillons avec la Bond Epitope Retrieval Solution 2 pendant 25 minutes à 100°C.

Pour le protocole HIER, créer un nouveau protocole comme décrit dans les instructions respectives pour l'utilisation du système automatisé Bond-

MAX/Bond-III. Sélectionner le protocole pour l'étape "HIER" dans Slide Setup.

2. Prétraiter les échantillons avec la BOND Enzyme Dilution à 37°C.

Pour la digestion enzymatique, choisissez un protocole selon des conditions pré-validées par l'utilisateur en fonction de l'échantillon et des conditions de HIER, de dénaturation et d'hybridation. Sélectionnez le protocole pour l'étape "Enzyme" dans Slide Setup.

Dénaturation et hybridation

1. Régler la dénaturation des échantillons à 10 minutes à 95°C.

*Sélectionnez le protocole prédéfini "*Dénaturation (10min)" pour l'étape de protocole "Dénaturation" dans Slide Setup.*

2. Régler l'hybridation des échantillons sur 12 heures à 37°C.

*Sélectionnez le protocole prédéfini "*ISH Hybridization (12Hr)" pour l'étape de protocole "Hybridization" dans Slide Setup.*

11.2 Cycle de marquage

1. Charger les lames, la sonde FISH, la dilution enzymatique et le BOND FISH Kit sur le système conformément au mode d'emploi.
2. Lorsque la coloration est terminée, retirer les lames de l'instrument. Protéger les lames de la lumière.

11.3 Post-hybridation et détection

1. Déshydrater les lames avec de l'éthanol à 70 %, 90 % et 100 % pendant 1 minute.
2. Sécher les échantillons à l'air dans l'obscurité.
3. Introduire à la pipette 20 µl de DAPI/DuraTect-Solution (**MT7**) sur les lames. En évitant les bulles, couvrir les échantillons avec une lamelle couvre-objet (24 mm x 50 mm). Incuber dans l'obscurité pendant 15 minutes.

L'utilisation d'une pointe de pipette coupée pour augmenter la taille de l'ouverture peut faciliter le processus de pipetage. Évitez toute exposition prolongée à la lumière.

4. Conservez la lame dans l'obscurité. Pour les périodes de stockage plus longues, il convient de le faire à une température comprise entre 2 et 8 °C.
5. L'évaluation de l'échantillon est effectuée par microscopie à fluorescence.

12. Interprétation des résultats

Avec l'utilisation de jeux de filtres appropriés, les signaux d'hybridation de la sonde apparaissent en vert (proximal par rapport à la région du point de rupture BCL2) et en orange (distal par rapport à la région du point de rupture BCL2).

Situation normale : Dans les interphases de cellules normales ou de cellules sans translocation impliquant la région du gène BCL2, deux signaux de fusion vert/orange apparaissent (Voir figure 2).

Situation aberrante : Une région du gène BCL2 affectée par une translocation est indiquée par un signal vert et un signal orange distincts (Voir figure 2).

Overlapping signals may appear as yellow signals.

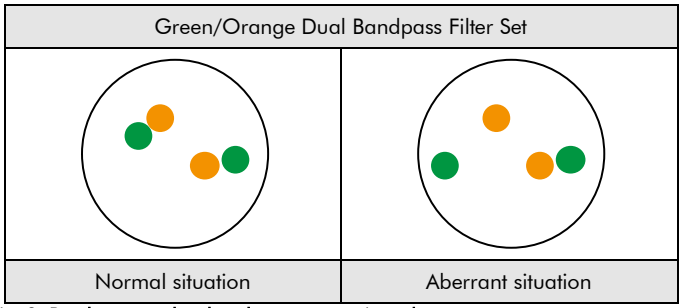

Fig. 2: Résultats attendus dans les noyaux en interphase normaux et présentant une aberration

Les aberrations génomiques dues à de petites délétions, duplications ou inversions peuvent donner lieu à des signaux discrets. D'autres modèles de signaux que ceux décrits ci-dessus peuvent être observés dans certains échantillons anormaux. Ces signaux inattendus doivent être étudiés de manière plus approfondie.

Veuillez noter :

- En raison de la chromatine décondensée, les signaux FISH simples peuvent apparaître comme de petits groupes de signaux. Ainsi, deux ou trois signaux de même taille, séparés par une distance ≤ 1 au diamètre de signal, doivent être comptés comme un seul signal.
- Ne pas prendre en compte les chevauchements de noyaux.
- Ne pas compter les noyaux trop digérés (reconnaissables par des zones noires visibles dans le noyau).
- Ne pas compter des noyaux ayant une forte auto-fluorescence, ce qui entrave la reconnaissance du signal.
- Un résultat négatif ou non spécifique peut être causé par de multiples facteurs (voir chapitre 16 "Assistance").
- Afin d'interpréter correctement les résultats, l'utilisateur doit valider ce produit avant de l'utiliser dans des procédures de diagnostic conformément aux directives nationales et/ou internationales.

13. Procédures de contrôle qualité recommandées

Afin de surveiller les performances correctes des échantillons traités et des réactifs d'essai, chaque dosage doit être accompagné de contrôles internes et externes. Si les contrôles internes et / ou externes n'indiquent pas un marquage approprié, les résultats avec les échantillons de patients doivent être considérés comme invalides.

Contrôle interne : Cellules non néoplasiques dans l'échantillon qui présentent un motif de signal normal, par exemple des fibroblastes.

Contrôle externe : Echantillons contrôles négatifs et positifs validés.

14. Caractéristiques de performances

14.1 Performance analytique

La performance de la sonde a été déterminée par comparaison avec la sonde FISH correspondante approuvée par le DIV.

Sensibilité analytique:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Spécificité analytique:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Performance clinique

Sensibilité diagnostique:	100% (95% CI 98.0 – 100.0) vs. FlexISH BCL2/BCL6 DistinguISH Probe
Spécificité diagnostique:	100% (95% CI 98.0 – 100.0) vs. FlexISH BCL2/BCL6 DistinguISH Probe

15. Elimination

L'élimination des réactifs doit être effectuée conformément à la réglementation locale.

16. Assistance

Tout écart par rapport au mode d'emploi peut conduire à des résultats de marquage inférieurs ou à aucun marquage du tout. Veuillez consulter le site www.zytovision.com pour plus d'informations.

Faible signal ou aucun signal

Cause possible	Action
L'échantillon de cellules ou de tissu n'est pas correctement fixé	Optimiser le temps de fixation et le fixateur utilisé
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimisez la concentration de l'enzyme et le temps d'incubation, augmentez ou diminuez si nécessaire.

Mauvais sets de filtres utilisés	Utiliser les sets de filtres appropriés aux fluorochromes de la sonde. *Les sets de filtres à triple bande passante offrent moins de luminosité par rapport aux sets de filtres à simple ou double bande passante. Par conséquent, les signaux peuvent sembler plus faibles en utilisant les sets de filtres à triple bande passante*

Signaux d'hybridation croisée ; bruit de fond

Cause possible	Action
Prétraitement protéolytique trop important	Réduire la concentration d'enzyme ou le temps d'incubation.

Morphologie détériorée

Cause possible	Action
Les échantillons de cellules ou de tissus n'ont pas été fixés correctement	Optimiser le temps de fixation et le fixateur
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser la concentration de l'enzyme ou le temps d'incubation, diminuer si nécessaire
Le prétraitement thermique n'est pas effectué correctement	Optimiser le prétraitement thermique

Noyaux chevauchants

Cause possible	Action
Epaisseur inappropriée des sections de tissu	Préparer des coupes au microtome de 2-4 µm d'épaisseur

Echantillon glissant sur la lame

Cause possible	Action
Séchage insuffisant de la coupe de tissu	Ajuster le temps pour sécher suffisamment les tissus avant le marquage
Fixation dans du formol qui n'était pas correctement tamponné à pH neutre	Utilisez du formol tamponné neutre de haute qualité

Contre coloration faible

Cause possible	Action
Solution DAPI faiblement concentrée	Utiliser à la place le produit DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. No. MT-0008-0.8)
Temps d'incubation avec le DAPI trop court	Ajuster le temps d'incubation avec le DAPI

17. Bibliographie

- 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. Révision

www.zytovision.com

Veuillez consulter le site www.zytovision.com pour obtenir le mode d'emploi le plus récent ainsi que des instructions d'utilisation dans différentes langues.

Nos experts sont disponibles pour répondre à vos questions.
Merci de nous contacter à helptech@zytovision.com
Pour le résumé de la sécurité et des performances, veuillez vous référer à www.zytovision.com.

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Allemagne
Téléphone : +49 471 4832-300
Fax : +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Courriel : info@zytovision.com

Marques déposées :
ZytoVision® et Zyto*Mation*® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.