ZytoMation

BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe

REF Z-2306-5.1ML 20 adede kadar (5.1 ml)

Otomatik Bond sistemlerinde floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile 18q21.33'teki insan BCL2 genini içeren translokasyonların kalitatif tespiti için

4250380P392RK

CE 0483

IVD

İn vitro diagnostik tıbbi cihaz

IVDR (AB) 2017/746'ya göre

1. Hedeflenen amaç

ZytoMation BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe (**PL260**), B-hücreli lenfomalar gibi formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü örneklerde 18q21.33'te insan BCL2 genini içeren translokasyonların floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile kalitatif tespiti için kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Prob, Leica Biosystems'in otomatik Bond-MAX veya Bond III sisteminde Bond FISH Kit(DS9636) ile birlikte kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Ürün sadece profesyonel kullanım için tasarlanmıştır. Ürünün kullanıldığı tüm testler sertifikalı, lisanslı bir anatomik patoloji laboratuvarında bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında kalifiye personel tarafından gerçekleştirilmelidir.

Prob, B hücreli lenfomaların ayırıcı tanısına yardımcı olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır ve terapötik önlemler yalnızca test sonucuna göre başlatılmamalıdır.

2. Test prensibi

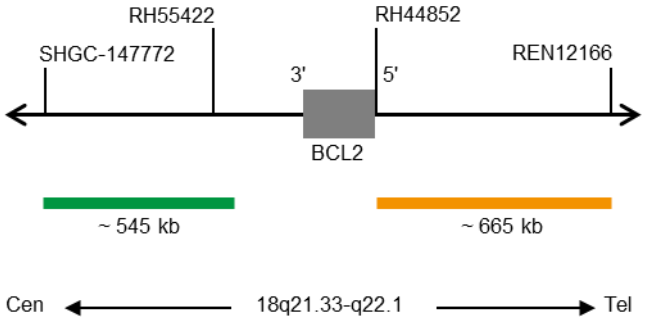
Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği, hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesini ve görüntülenmesini sağlar. FISH probları olarak adlandırılan floresan işaretli DNA parçaları ve preparatlardaki tamamlayıcı hedef DNA iplikleri birlikte denatüre edilir ve daha sonra hibridizasyon sırasında tavlanmasına izin verilir. Daha sonra, spesifik olmayan ve bağlanmamış prob parçaları sık yıkama adımları ile uzaklaştırılır. DNA'nın DAPI ile karşı boyanmasından sonra, hibridize prob parçaları, FISH prob parçalarının doğrudan etiketlendiği florokromlara özgü uyarma ve emisyon filtreleri ile donatılmış bir floresan mikroskobu kullanılarak görselleştirilir.

3. Sağlanan reaktifler

ZytoMation BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe oluşmaktadır:

- ZyGreen (eksitasyon 503 nm/emisyon 528 nm) işaretli polinükleotidler (~6,0 ng/µl), 18q21.33* (chr18:60,046,152-60,589,273) BCL2 kırılma noktası bölgesinin proksimalinde eşlenen dizileri hedefler (bkz. Şekil 1).
- BCL2 kırılma noktası bölgesinin distalinde 18q21.33-q22.1* (chr18:60,994,528-61,658,503) içinde eşlenen dizileri hedefleyen ZyOrange (eksitasyon 547 nm/emisyon 572 nm) etiketli polinükleotidler (~2,5 ng/µl) (bkz. Şekil 1).
- Formamid bazlı hibridizasyon tamponu

*İnsan Genomu Düzenlemesine göre GRCh37/hg19



Şekil 1: BCL2 sonda haritası (ölçekli değil)

ZytoMation BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe tek boyutta mevcuttur:

- Z-2306-5.1ML: 5.1 ml (her biri 240 µl'lik 20 reaksiyona kadar)

4. Gerekli ancak sağlanmayan malzemeler

- Leica Biosystems tarafından üretilen Bond-MAX veya Bond-III sistemi
- Bond FISH Kit (DS9636)
- Bond Epitope Retrieval Solution 2 (AR9640)
- Bond Enzyme Pretreatment Kit (AR9551)
- DAPI/DuraTect-Solution (MT-0007-0.8)
- Pozitif ve negatif kontrol numuneleri
- Mikroskop lamları, pozitif yüklü
- Ayarlanabilir pipetler (20 µl, 1000 µl)
- Boyama kavanozları veya banyoları
- Zamanlayıcı
- Etanol veya reaktif alkol
- Deiyonize veya damıtılmış su
- Kapaklı Klipsler (24 mm x 50 mm)
- Yeterince bakımı yapılmış floresan mikroskobu (400-1000x)
- Floresan mikroskobu için onaylı daldırma yağı
- Uygun filtre setleri

Gerekli olan ancak sağlanmayan malzemeler hakkında daha fazla bilgi için lütfen ilgili tam otomatik boyama sisteminin kullanım talimatlarına bakın.

5. Depolama ve taşıma

2-8 °C'de dik konumda ışıktan koruyarak saklayın.
Işıktan korunarak kullanın. Flakonu açmadan önce sıvıyı çalkalayın. Kullanımdan hemen sonra saklama koşullarına geri döndürün. Etiket üzerinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra reaktifleri kullanmayın. Ürün, uygun şekilde kullanıldığında etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

6. Uyarılar ve önlemler

- Kullanmadan önce kullanım talimatlarını okuyun!
- Reaktifleri son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanmayın!
- Prob manuel FISH prosedürlerinde kullanılmamalıdır!
- Bu ürün sağlığa zararlı ve potansiyel olarak bulaşıcı maddeler (düşük konsantrasyonlarda ve hacimlerde) içerir. Reaktiflerle doğrudan temastan kaçının. Uygun koruyucu önlemleri alın (tek kullanımlık eldivenler, koruyucu gözlükler ve laboratuvar giysileri kullanın)!

- Ürünle ilgili olarak meydana gelen her türlü ciddi olayı yerel yönetmeliklere uygun olarak üreticiye ve yetkili makama bildirin!
- Reaktifler ciltle temas ederse, cildi derhal bol miktarda suyla yıkayın!
- Profesyonel kullanıcılar için talep üzerine bir malzeme güvenlik bilgi formu temin edilebilir.
- Yeniden kullanıma açıkça izin verilmediği sürece reaktifleri yeniden kullanmayın!
- Hatalı sonuçlara yol açabileceğinden numunelerin çapraz kontaminasyonundan kaçının.
- Prob uzun süre ışığa, özellikle de güçlü ışığa maruz bırakılmamalıdır, yani tüm adımlar mümkünse karanlıkta ve/veya ışık geçirmez kaplar kullanılarak gerçekleştirilmelidir.

Tehlike ve önlem beyanları:

Tehlikeyi belirleyen bileşen formamiddir.

Tehlike

H351	Kansere neden olduğundan şüpheleniliyor.
H360FD	Doğurganlığa zarar verebilir. Doğmamış çocuğa zarar verebilir.
H373	Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara neden olabilir.
P201	Kullanmadan önce özel talimatları alın.
P202	Tüm güvenlik önlemleri okunup anlaşılmadan elleçlemeyin.
P260	Toz/duman/gaz/sis/buhar/sprey solumayın.
P280	Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruması/yüz koruması kullanın.
P308+P313	Maruz kaldıysanız veya endişeliyseniz: Tıbbi tavsiye/müdahale alın.
P405	Depo kilitli.

7. Sınırlamalar

- *İn vitro* diagnostik kullanım için.
- Sadece profesyonel kullanım içindir.
- Yalnızca tam otomatik Bond-MAX veya Bond-III sisteminde (Leica) kullanım için.
- Herhangi bir pozitif boyamanın klinik yorumu veya yokluğu, klinik öykü, morfoloji, diğer histopatolojik kriterler ve diğer tanı testleri bağlamında yapılmalıdır. FISH probları, reaktifleri, tanı panelleri ve boyalı preparatı üretmek için kullanılan yöntemler hakkında bilgi sahibi olmak kalifiye bir patolog/insan genetikçisinin sorumluluğundadır. Boyama, boyanmış slaytları gözden geçirmekten ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğini sağlamaktan sorumlu olan bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında sertifikalı, lisanslı bir laboratuvarda yapılmalıdır.
- Numune boyaması, özellikle sinyal yoğunluğu ve arka plan boyaması, boyamadan önce numunenin kullanımına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözdürme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer numuneler veya sıvılarla kontaminasyon artefaktlara veya yanlış sonuçlara neden olabilir. Tutarsız sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki farklılıkların yanı sıra numunedeki doğal düzensizliklerden de kaynaklanabilir.
- Prob yalnızca bölüm 3'te açıklanan lokusları tespit etmek için kullanılmalıdır. "Sağlanan reaktifler".
- Performans, tam otomatik Bond-MAX sistemi (Leica) ve bu kullanım talimatında açıklanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılacak değişiklikler performansı CE-IVD olarak değiştirebilir ve kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Bu IVD, yalnızca bu kullanım talimatında açıklandığı şekilde amaçlanan kullanım kapsamında kullanıldığında CE sertifikasına sahiptir.

8. Müdahale eden maddeler

Örnekte bulunan kırmızı kan hücreleri, sinyalin tanınmasını engelleyen otofloresans sergileyebilir.

Aşağıdaki fiksatifler FISH ile uyumlu değildir:

- Bouin'in fiksatifi
- B5 fiksatif
- Asidik fiksatifler (örn. pikrik asit)
- Zenker fiksatifi
- Alkoller (tek başına kullanıldığında)
- Merkürik klorür
- Formaldehit/çinko fiksatifi
- Hollande'ın sabitleyicisi

Tamponlanmamış formalin

9. Numunelerin hazırlanması

Tavsiyeler:

- Oda sıcaklığında (18-25 °C) 24 saat boyunca %10 nötral tamponlu formalin içinde fiksasyon.
- Örnek boyutu ≤ 0,5 cm^3 .
- Üstün kaliteli parafin kullanın.
- Gömme işlemi 65 °C'den daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmelidir.
- 2-4 μm mikrotom kesitleri hazırlayın.
- Pozitif yüklü mikroskop lamları kullanın.
- 50-60 °C'de 2-16 saat boyunca sabitleyin.

10. Cihazın hazırlık işlemi

Sulandırma, karıştırma veya seyreltme gerekmez. Kullanmadan önce probu oda sıcaklığına (18-25 °C) getirin, ışıktan koruyun. Flakonu açmadan önce vorteksleyerek karıştırın ve kısa bir süre çalkalayın.

11. Tahlil prosedürü

Zyto*Mation* BCL2 Dual Color Break Apart FISH Probe ilgili FISH kitleri ve FISH protokolleri ile birlikte tam otomatik Bond-MAX veya Bond-III sisteminde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Daha fazla bilgi için lütfen kullanılan sistemin ilgili kullanım talimatlarına bakın.

11.1 Tam otomatik Bond-MAX veya Bond-III sisteminde Lam Kurulumu

Lam Kurulumu Menüsünde aşağıdaki protokol adımlarını ayarlayın:

Boyama:	*FISH Protocol D
Hazırlık:	*Dewax
HIER:	set up as described in step 1 below
Enzim:	set up as described in step 2 below
Denatürasyon:	*Denaturation (10min)
Hibridizasyon:	*ISH Hybridization (12Hr)

Numune ön işlemi
Tam otomatik boyama sisteminin kullanımı için ilgili talimatlara göre numune ön işlemlerini (mum alma, proteoliz) gerçekleştirin.

Numuneye bağlı olarak, protokolde ayarlamalar yapılması gerekebilir. Önerilen protokollerden sapan protokollerin validasyonu kullanıcı tarafından yapılmalıdır.

1. Örnekleri Bond Epitope Retrieval Solution 2 ile 100°C'de 25 dakika ön işleme tabi tutun.

HIER protokolü için, otomatik Bond-MAX/Bond-III sisteminin kullanımına yönelik ilgili talimatlarda açıklandığı şekilde yeni bir protokol oluşturun. Slide Setup'ta protokol adımı "HIER" için protokolü seçin.

2. Örnekleri 37°C'de BOND Enzyme Dilution le ön işleme tabi tutun.

Enzim sindirimi için, numuneye ve HIER, denatürasyon ve hibridizasyon koşullarına bağlı olarak kullanıcı tarafından önceden valide edilmiş koşullara göre bir protokol seçin. Lam Kurulumunda "Enzim" protokol adımı için protokolü seçin.

Denatürasyon ve hibridizasyon

1. Örneklerin denatürasyonunu 95°C'de 10 dakikaya ayarlayın.

*Lam Kurulumunda "Denatürasyon" protokol adımı için önceden tanımlanmış "*Denaturation (10min)" protokolünü seçin.*

2. Örneklerin hibridizasyonunu 37°C'de 12 saate ayarlayın.

*Lam Kurulumunda "Hibridizasyon" protokol adımı için önceden tanımlanmış"*ISH Hybridization (12Hr)" protokolünü seçin.*

11.2 Boyama çalışması

1. Lamları, FISH probunu, enzim dilüsyonunu ve BOND FISH Kit kullanım talimatlarına göre sisteme yükleyin.
2. Boyama işlemi tamamlandığında lamları cihazdan çıkarın. Lamları ışıktan koruyun.

11.3 Hibridizasyon sonrası ve tespit

3. Lamları %70, %90 ve %100 etanol ile 1'er dakika kurutun.
4. Örnekleri karanlıkta hava ile kurutun.
5. Lamların üzerine 20 µl DAPI/DuraTect-Solution (**MT7**) pipetleyin. Sıkışan kabarcıklardan kaçınarak örnekleri bir lamel (24 mm x 50 mm) ile örtün. Karanlıkta 15 dakika inkübe edin.

Açıklığın boyutunu artırmak için kesilmiş bir pipet ucu kullanmak pipetleme işlemini kolaylaştırabilir. Uzun süre ışığa maruz kalmaktan kaçının.

6. Lamı karanlıkta saklayın. Daha uzun saklama süreleri için bu işlem 2-8 °C'de gerçekleştirilmelidir.
7. Örnek malzemenin değerlendirilmesi floresan mikroskobu ile gerçekleştirilir.

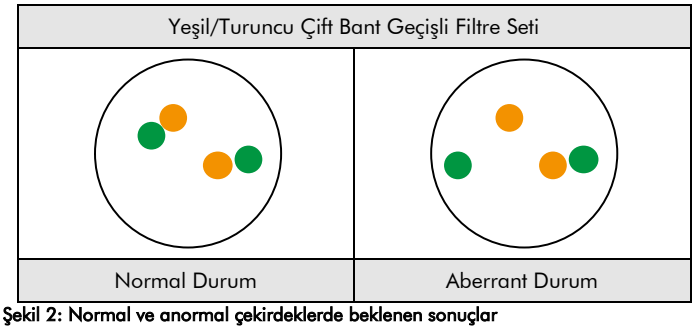
12. Sonuçların yorumlanması

Uygun filtre setleri kullanıldığında, probun hibridizasyon sinyalleri yeşil (BCL2 kırılma noktası bölgesinin proksimalinde) ve turuncu (BCL2 kırılma noktası bölgesinin distalinde) görünür.

Normal durum: Normal hücrelerin veya BCL2 gen bölgesini içeren bir translokasyonu olmayan hücrelerin interfazlarında, iki yeşil/turuncu füzyon sinyali görülür (bkz. Şekil 2).

Anormal bir durum: Bir translokasyondan etkilenen bir BCL2 gen bölgesi, bir ayrı yeşil sinyal ve bir ayrı turuncu sinyal ile gösterilir (bkz. Şekil 2).

Çakışan sinyaller sarı sinyaller olarak görünebilir.



Şekil 2: Normal ve anormal çekirdeklerde beklenen sonuçlar

Küçük delesyonlar, duplikasyonlar veya inversiyonlardan kaynaklanan genomik sapmalar göze çarpmayan sinyal modellerine neden olabilir. Bazı anormal numunelerde yukarıda açıklananlardan farklı sinyal modelleri gözlemlenebilir. Bu beklenmedik sinyal modelleri daha fazla araştırılmalıdır.

Lütfen unutmayın:

- Dekondense kromatin nedeniyle, tek FISH sinyalleri küçük sinyal kümeleri olarak görünebilir. Bu nedenle, ≤ 1 sinyal çapı mesafeyle ayrılmış aynı boyuttaki iki veya üç sinyal tek bir sinyal olarak sayılmalıdır.
- Örtüşen çekirdekleri değerlendirmeyin.
- Aşırı sindirilmiş çekirdekleri saymayın (çekirdeklerin içinde görünen koyu alanlarla tanınır).
- Sinyal tanımayı engelleyen güçlü oto-floresanslı çekirdekleri saymayın.
- Negatif veya spesifik olmayan bir sonuç birden fazla faktörden kaynaklanabilir (bkz. Bölüm 16 "Sorun Giderme").
- Sonuçların doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için, kullanıcı bu ürünü tanı prosedürlerinde kullanmadan önce ulusal ve/veya uluslararası kılavuzlara göre doğrulamalıdır.

13. Önerilen kalite kontrol prosedürleri

İşlenmiş numunelerin ve test reaktiflerinin doğru performansını izlemek için, her tahlile dahili ve harici kontroller eşlik etmelidir. Dahili ve/veya harici kontroller uygun boyamayı gösteremezse, hasta numuneleriyle elde edilen sonuçlar geçersiz kabul edilmelidir.

Dahili kontrol: Örnek içinde normal sinyal paterni sergileyen neoplastik olmayan hücreler, örneğin fibroblastlar.

Harici kontrol: Onaylanmış pozitif ve negatif kontrol numuneleri.

14. Performans özellikleri

14.1 Analitik performans

Probun performansı, ilgili IVD onaylı FISH probu ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Analitik hassasiyet:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analitik özgüllük:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

Günden Güne Tekrar Üretilebilirlik, bir denetçinin 10 farklı günde elde ettiği sonuçları karşılaştırarak ve uyumu değerlendirerek test edilmiştir..

	Yüzde Anlaşma
negatif numune	100%
pozitif numune	100%

Tekrarlanabilirlik, bir denetçiden 10 farklı günde elde edilen tekrarlanan sonuçlar karşılaştırılarak ve uyum değerlendirilerek test edilmiştir.

	Yüzde Anlaşma
negatif numune	100%
pozitif numune	100%

14.2 Klinik performans

Tanısal duyarlılık:	100% (95% CI 98.0 – 100.0) vs. FlexISH BCL2/BCL6 DistinguISH Probe
Teşhis özgüllüğü:	100% (95% CI 98.0 – 100.0) vs. FlexISH BCL2/BCL6 DistinguISH Probe

15. Bertaraf

Reaktiflerin imhası yerel yönetmeliklere uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

16. Sorun Giderme

Kullanım talimatlarından herhangi bir sapma, düşük boyama sonuçlarına veya hiç boyama olmamasına neden olabilir. Daha fazla bilgi için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Zayıf sinyaller veya hiç sinyal yok

Olası neden	Eylem
Hücre veya doku örneği uygun şekilde sabitlenmemiş	Sabitleme süresini ve fiksatifi optimize edin
Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış	Enzim konsantrasyonunu ve inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Kullanılan uygunsuz filtre setleri	Probun flokromlarına uygun filtre setleri kullanın. *Üçlü bant geçiren filtre setleri, tekli veya ikili bant geçiren filtre setlerine kıyasla daha az ışık sağlar. Sonuç olarak, bu üçlü bant geçiren filtre setleri kullanıldığında sinyaller daha soluk görünebilir*

Çapraz hibridizasyon sinyalleri; gürültülü arka plan

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Enzim konsantrasyonunu veya inkübasyon süresini azaltın

Morfoloji bozulmuş

Olası neden	Eylem
Hücre veya doku örneği uygun şekilde sabitlenmemiştir	Sabitleme süresini ve fiksatifi optimize edin
Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış	Enzim konsantrasyonunu veya inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse azaltın
Isıl ön işlem düzgün yapılmamış	Isıl ön işlemi optimize edin

Örtüşen çekirdekler

Olası neden	Eylem
Doku kesitlerinin uygun olmayan kalınlığı	2-4 µm mikrotom kesitleri hazırlayın

Numune lam üzerinde yüzer

Olası neden	Eylem
Doku kesitinin yetersiz kurutulması	Boyamadan önce dokuları yeterince kurutmak için süreyi ayarlayın
Uygun şekilde nötr tamponlanmamış formalin içinde fiksasyon	Yüksek kalitede uygun nötr tamponlu formalin kullanın

Zayıf karşı leke

Olası neden	Eylem
Düşük konsantrasyonlu DAPI çözeltisi	Bunun yerine DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Ürün No. MT-0008-0.8) kullanın
DAPI inkübasyon süresi çok kısa	DAPI inkübasyon süresini ayarlayın

17. Edebiyat

- 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. Revizyon

Revizyon	Onaylanmış kuruluş değişikliği
4.1.1	Onaylanmış kuruluş değişikliği 14. Performans özellikleri doğruluk ekleme
4.2.1	BCL2 sonda haritası güncellendi

www.zytovision.com

En güncel kullanım talimatları ve farklı dillerdeki kullanım talimatları için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamak için hazırdır.
Lütfen helptech@zytovision.com ile iletişime geçin
Güvenlik ve performans özeti için lütfen bkz. www.zytovision.com..

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Almanya
Telefon numarası: +49 471 4832-300
Faks: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-posta: info@zytovision.com

Ticari markalar:
ZytoVision® ve Zyto*Mation*® , ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.