Advancing Cancer Diagnostics
Improving Lives

Kreatech™ FISH probes
DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND

Catalog No: KBI-XL015

EN - Instructions for use
FR - Mode d'emploi
DE - Gebrauchsanleitung
IT - Istruzioni per l'uso
ES - Instrucciones de uso
PT - Instruções de Utilização
NL - Gebruiksaanwijzing
SE - Instruktioner för användning
DA - Brugsanvisning
TR - Kullanma talimatları

Table of Contents

EN	- Instructions for use	5
FR	- Mode d'emploi	19
DE	- Gebrauchsanleitung	33
IT	- Istruzioni per l'uso	49
ES	- Instrucciones de uso	63
PT	- Instruções de Utilização	79
NL	- Gebruiksaanwijzing	93
SE	- Instruktioner för användning	109
DA	- Brugsanvisning	123
TR	- Kullanma talimatları	137

EN

Kreatech™ FISH probes
DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND
Catalog No: KBI-XL015

Intended Use

For *in vitro* diagnostic use

DDIT3 (12q13) Break - XL for BOND is intended for use on sarcoma formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue sections. The probes are to be used in combination with the BOND FISH Kit (DS9636) on an automated BOND system (includes BOND-MAX system and BOND-III system).

The DDIT3 (12q13) Break - XL for BOND FISH probe detects genomic translocations involving the DDIT3 gene in FFPE tissues. The probe has been validated on sarcoma tissues.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies and proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Summary and Explanation

Kreatech FISH probes are used to perform a fluorescence *in situ* hybridization (FISH) staining procedure on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Following appropriate pretreatment, hybridization of Kreatech FISH probes and post-hybridization stringent washing

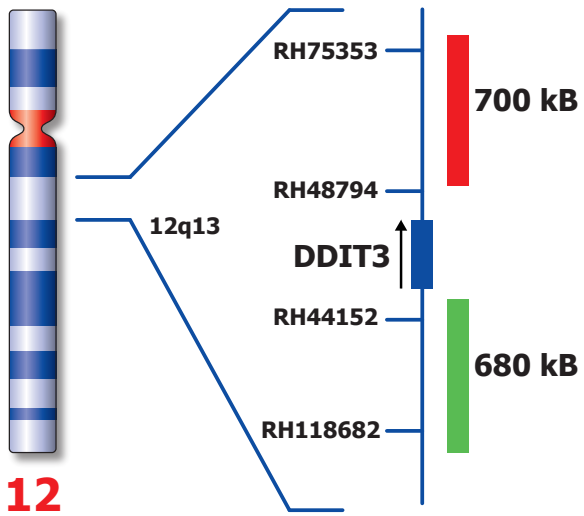
using the BOND FISH kit, tissue sections are to be manually dehydrated and mounted with DAPI. Results are interpreted by fluorescence microscopy using the recommended filters with the appropriate wavelengths.

Reagents Provided

Product Description	Product No.	Volume	Composition
DDIT3 (12q13) Proximal – XL	pKBI-XL015R	1 ml, 10x concentrate	Platinum*Bright* ™ 550 fluorophore-labeled DNA probes in hybridization buffer. Hybridization buffer contains < 50% Formamide
DDIT3 (12q13) Distal – XL	pKBI-XL015G	1 ml, 10x concentrate	Platinum*Bright* ™ 495 fluorophore-labeled DNA probes in hybridization buffer. Hybridization buffer contains < 50% Formamide

DDIT3 (12q13) Proximal - XL is optimized to detect genomic regions proximal to break points in the DDIT3 gene region.
DDIT3 (12q13) Distal - XL is optimized to detect genomic regions distal to break points in the DDIT3 gene region.
Both probes combined are used to detect translocations involving the DDIT3 gene at 12q13.

Table 1: Chromosome map showing the size of the probes in kilobasepair (kB), chromosome band, and genomic position defined by STS markers[1]. The arrow adjacent to the gene indicates the transcription direction of the gene. In green DDIT3 (12q13) Distal - XL. In red DDIT3 (12q13) Proximal - XL. See the Leica website for more information on chromosome maps.



1) Maps and locations are based on UCSC genome browser, build GRCh37/hg19, Feb.2009.

Materials Required But Not Provided

Refer to “Using BOND Reagents” in your BOND user documentation for a complete list of materials required for specimen treatment and *in situ* hybridization using the BOND system (includes BOND-MAX system and BOND-III system).

In addition to the generic BOND reagents, the following reagents are specifically required for the analysis of suitable patient material using Kreatech FISH probes on the BOND system (includes BOND-MAX system and BOND-III system).

- BOND FISH kit (DS9636)

Kreatech FISH probes are run on a BOND system (includes BOND-MAX system and BOND-III system) in combination with the BOND FISH kit (DS9636). The BOND FISH kit in combination with *FISH Protocol D, preinstalled on the BOND system with BDZ v62 or higher, is necessary for FISH to be run on the BOND system. This protocol is designed as a post-hybridization wash protocol, to reduce non-specific hybridization of nucleic acid probes. The BOND FISH kit contains the post-hybridization wash buffer and a single kit is sufficient for 60 tests.

- BOND Hybridization solution (AR9037)

The probes are to be diluted to the preferred concentration using the BOND Hybridization solution.

- BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551)

Enzyme digestion in combination with heat pretreatment is required for optimal FISH results.

- DAPI (e.g. LK-095A or LK-096A)

DAPI counterstaining is not automatically performed as part of the FISH protocol on BOND and is to be done manually using the preferred concentration of DAPI counterstain / antifade.

Specimens

Kreatech FISH probes have been tested on FFPE tissues which were cut at ~5 µm. Tissue blocks and cut slides should be stored according to the recommended storage and handling conditions for optimal results, see Leica website.

Baking can be done either on the BOND using the *Bake and Dewax protocol or separately in an oven or incubator. Recommended baking temperature and time is up to 16 hrs at 56°C, or 60 - 120 min at 80°C.

Instructions for use: Dilution and Mixing

Kreatech FISH probes are provided in a 10x concentrated format and are to be combined and diluted to a 1x final concentration using the BOND Hybridization Solution (AR9037).

Reagent	Volume used (recommended)
Probe 1 (10x) - Red	1.0 ml
Probe 2 (10x) - Green	1.0 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8.0 ml
Total volume (1x final concentration)	10 ml
# Tests	Up to 40 tests

After dilution of the probe, the mixture is to be transferred to an appropriate BOND container (titration container, 7 ml open container or 30 ml open container, depending on prepared volumes) and registered as “DNA probe” in the BOND.

When preparing dilutions for titration, ensure that allowance is made for the dead volume of the appropriate BOND Open Container (for values refer to your BOND user documentation). The exact number of tests from a vial depends on the dead volume of the used container and the calibration of the BOND system.

See Troubleshooting section for use of final concentrations other than 1x.

Refer to “Reagent Management” in your BOND user documentation for information about registering new reagents on the BOND system (includes BOND-MAX system and BOND-III system).

EN

Instructions for use: Pretreatment and Protocols

Kreatech FISH probes have been validated using the BOND FISH kit, BOND ancillary reagents and the BOND pretreatment and staining protocols shown in Table 2. The final protocol may vary according to the tissue used by the user. Any deviations from the prescribed protocols must be validated by the user.

Table 2: Protocols for running Kreatech FISH probes

BOND Protocol Section	Protocol Name	Protocol Type
Staining – ISH Detection	*FISH Protocol D	Post Hybridization Wash
Prestaining – Preparation	*Dewax	Removal of paraffin
Prestaining – Heat Pretreatment	HIER 25 min with ER2 (100) (1)	Heat pretreatment, Epitope retrieval
Prestaining – Enzyme Pretreatment	*Enzyme 5 for 35 min (2)	Enzymatic digestion
Prestaining – ISH denaturation	*D10	Denaturation 10 min.
Prestaining - ISH detection	*ISH Hybridization (12Hr)	Hybridization 12 hr.

(1) Not a predefined protocol. For creating the 35 min HIER protocol refer to “Protocols” in your BOND user documentation.

(2) Enzyme 5 is derived from Enzyme Concentrate 1 available in the BOND Enzyme Pretreatment Kit (AR9551). See Troubleshooting section below for specifics.

Signal patterns

DDIT3 (12q13) Break - XL for BOND can be used to detect translocations involving the DDIT3 gene in FFPE tissues. The probe has been validated on sarcoma tissues using the protocols shown in table 2.

DDIT3 (12q13) Break - XL for BOND is designed as a dual-color assay to detect translocations of the DDIT3 gene region at 12q13. The normal signal pattern shows two red/green fusion signals (2F), while a translocations involving the DDIT3 gene results in one fusion signal for normal chromosome 12 and one red and one green signal for the translocation (1F1R1G).

Follow-up testing is advised if other, atypical patterns are observed.

	Normal Signal Pattern	Translocation involving DDIT3 gene at 12q13
Expected Pattern	2F	1F1R1G

Consult the local or general guidelines for interpretation of signal patterns other than shown in the table.

Disclaimer: The performance of DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND has been established using the procedures described in this package insert. Modifications to these procedures may alter the performance of the assay. Any deviations from the instructed protocols must be validated by the user.

Storage and Stability

Protect probes from strong and direct light.

Store at 2 - 8 °C. The unopened product is stable under these conditions up to the expiry date indicated on the vial label.

Return undiluted reagent to 2 - 8 °C immediately after use. Diluted/mixed probe reagent stored in a BOND container should be returned to 2 - 8 °C after being run.

After probe dilution, probes mixtures are stable for up to 30 days. After this time period the diluted mixture may result in suboptimal results.

There are no obvious signs that indicate contamination and/or instability of the probe.

Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

Troubleshooting

Pretreatment (overdigestion): The Instructions For Use of the BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551) recommends a dilution of 1 drop of Enzyme Concentrate 1 into 7 ml of Diluent to be registered as *Enzyme 1 in the BOND software.

This *Enzyme 1 may be too strong for certain specimens when used in combination with the Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) and results in overdigested tissue. A secondary dilution of the *Enzyme 1 (up to 1:300 dilution) is recommended and a separate registration of the reagent on the BOND system as *Enzyme 5 is recommended

to prevent confusion. Alternatively, a direct dilution of up to 1:3000 of Enzyme concentrate 1 can be used instead of the serial dilution of *Enzyme 1.

Probe dilution and Signal intensity: A 1x final probe concentration is recommended for use but optimal probe balance is dependent on factors such as tissue age, tissue fixation, pretreatment protocol, and personal preference. Optimal concentrations and probe ratios may vary and are to be determined empirically by the end-user.

Reagent	Volume used (recommended)	Example: Reduce Green signal strength	
Probe 1 (10x) - Red	1.0 ml	Red at 1x:	1.0 ml
Probe 2 (10x) - Green	1.0 ml	Green at 0.5x:	0.5 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8.0 ml		8.5 ml
Total volume at 1x final concentration	10 ml		10 ml
Number of tests	up to 40 tests		up to 40 tests

Contact your local distributor or the customer care of regional office of Leica Biosystems to report any unusual staining.

Product Specific Limitations

Users who deviate from recommended test procedures must accept responsibility for interpretation of patient results under these circumstances. Protocol times may vary due to variation in tissue type, fixation and processing. In addition, BOND Enzyme concentration and incubation time may require optimization depending on tissue type, processing and fixation conditions.

Further Information

Further information on *in situ* hybridization with BOND reagents can be found in your BOND user documentation.

Warnings and Precautions

- This product is intended for *in vitro* diagnostic use only
- For laboratory / professional-use only
- Kreatech FISH probes are intended for use on BOND systems.
- Do not use reagents after the expiry date given on the package label
- Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection
- Kreatech FISH probes contain formamide and should therefore be registered in the BOND software as hazardous waste
- Formamide may have adverse effects upon human reproduction. Avoid inhalation, ingestion or contact with unprotected skin. If contact with skin occurs, wash with copious amounts of water for at least 15 minutes

DANGER

FORMAMIDE

Hazard statement

H360D May damage the unborn child.

Precautionary statements

P201 Obtain special instructions before use.

P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P308+P313 If exposed or concerned: Get medical advice/attention.

P405 Store locked up.

P501 Dispose of contents/container to authorised chemical landfill or if organic to high temperature incineration

Consult the SDS for full details. To obtain a copy of the Safety Data Sheet contact your local distributor or regional office of Leica Biosystems. Safety Data Sheets are available on the Leica Biosystems website, www.LeicaBiosystems.com

- Specimens, before and after fixation and all materials exposed to them, as well as leftover probe volume, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions
- Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents or specimens

- If reagents or specimens come into contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice
- Clean up spillages immediately using suitable disposable materials
- All materials must be disposed of in accordance with local legislation.
- Retrieval steps, incubation times or temperatures, other than those specified, may give erroneous results. Any such change must be validated by the user.

Bibliography

1. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
2. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
3. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *in situ* Hybridization. A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.1 - 13.
4. FISH on BOND User Guide

FR

Kreatech™ FISH probes
DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND
Numéro de référence: KBI-XL015

Utilisation prévue
Pour le diagnostic *in vitro*
DDIT3 (12q13) Break - XL for BOND est destiné à être utilisé sur des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) de sarcome. Les sondes doivent être utilisées en association avec le BOND FISH kit (DS9636) dans un système automatisé BOND (comprenant les systèmes BOND-MAX et BOND-III).
La sonde DDIT3 (12q13) Break - XL for BOND FISH détecte les translocations génomiques impliquant le gène DDIT3 dans des tissus FFPE. La sonde a été validée sur des tissus de sarcome.
L'interprétation clinique de toute coloration ou absence de celle-ci doit être complétée par des études morphologiques et des contrôles adéquats, et faire l'objet d'une évaluation dans le contexte des antécédents cliniques du patient et d'autres tests de diagnostic réalisés par un anatomo-pathologiste qualifié.

Résumé et explications
Les Kreatech FISH probes sont utilisées pour réaliser une procédure de coloration d'hybridation *in situ* fluorescente (Fluorescent *In situ* Hybridization - (FISH)) sur des tissus inclus dans la paraffine et fixés

au formol. Suite à un pré-traitement adéquat, à l'hybridation des Kreatech FISH probes et au lavage rigoureux post-hybridation à l'aide du BOND FISH kit, les coupes tissulaires doivent être déshydratées manuellement et montées avec du DAPI. L'interprétation des résultats s'effectue par microscopie à fluorescence à l'aide des filtres recommandés et des longueurs d'ondes adéquates.

Réactifs fournis

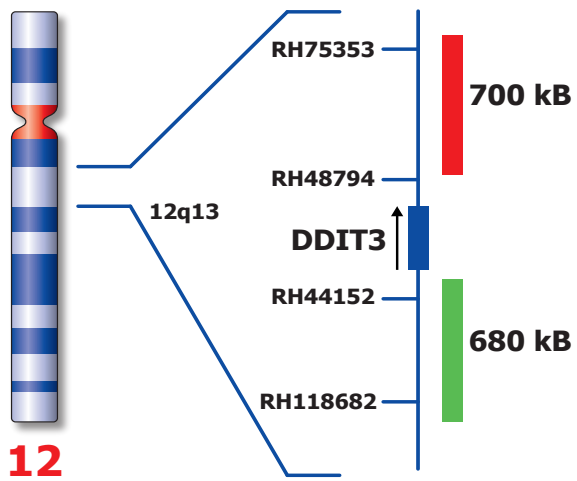
Description du produit	Numéro de produit	Volume	Composition
DDIT3 (12q13) Proximal – XL	pKBI-XL015R	1 ml, 10x concentré	Sondes ADN marquées au fluorophore Platinum*Bright*™550 sont dans un tampon d'hybridation. Le tampon d'hybridation contient < 50 % de formamide
DDIT3 (12q13) Distal – XL	pKBI-XL015G	1 ml, 10x concentré	Sondes ADN marquées au fluorophore Platinum*Bright*™495 sont dans un tampon d'hybridation. Le tampon d'hybridation contient < 50 % de formamide

DDIT3 (12q13) Proximal - XL est optimisé pour détecter des régions génomiques proximales aux points de rupture dans la région du gène DDIT3.

DDIT3 (12q13) Distal - XL est optimisé pour détecter des régions génomiques distales aux points de rupture dans la région du gène DDIT3.

Les deux sondes combinées sont utilisées pour détecter les translocations impliquant le gène DDIT3 à 12q13.

Tableau 1 : carte de chromosomes montrant la taille des sondes en kilopaires de base (kpb), la bande de chromosome et la position génomique définie par des marqueurs STS[1]. La flèche en regard du gène indique la direction de transcription du gène. Dans DDIT3 (12q13) Distal - XL vert. Dans DDIT3 (12q13) Proximal - XL rouge.
Consultez le site Web Leica pour de plus amples informations sur les cartes de chromosomes.



1) Les cartes et emplacements sont basés sur UCSC genome browser, build GRCh37/hg19, Feb.2009.

Matériel requis mais non fourni:

Consultez la rubrique « Utilisation des réactifs BOND » de votre documentation d'utilisateur BOND pour obtenir la liste complète des matériaux requis pour le traitement de spécimens et d'hybridation *in situ* à l'aide du système BOND (comprenant les systèmes BOND-MAX et BOND-III).

Outre les réactifs génériques BOND, les réactifs suivants sont spécifiquement requis pour l'analyse des matières adéquates provenant du patient à l'aide des Kreatech FISH probes sur le système BOND (comprenant les systèmes BOND-MAX et BOND-III).

- BOND FISH kit (DS9636)

Les Kreatech FISH probes sont utilisées sur un système BOND (comprenant un système BOND-MAX et un système BOND-III) avec le kit BOND FISH (DS9636). Le BOND FISH kit en association avec le *FISH Protocol D, préinstallé sur le système BOND avec BDZ v62 ou version plus récente, est nécessaire pour utiliser FISH sur le système BOND. Ce protocole de lavage post-hybridation a été conçu afin de réduire l'hybridation non spécifique de sondes d'acide nucléique. Le BOND FISH kit contient le tampon de lavage post-hybridation ; un seul kit suffit pour 60 tests.

- BOND Hybridization solution (AR9037)

Les sondes doivent être diluées à la concentration privilégiée à l'aide de la BOND Hybridization solution.

- BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551)

La digestion enzymatique avec pré-traitement à la chaleur est requise

pour l'obtention de résultats FISH optimaux.

- DAPI (par ex., LK-095A ou LK-096A)

La contre-coloration au DAPI n'est pas réalisée automatiquement dans le cadre du protocole FISH sur BOND et doit s'effectuer manuellement en employant la concentration privilégiée de DAPI counterstain / antifade.

Spécimens

Les Kreatech FISH probes ont été testées sur des tissus FFPE coupés à ~5 µm. Les blocs tissulaires et les lames de coupes doivent être stockés conformément aux conditions de stockage et de manipulation recommandées pour l'obtention de résultats optimaux, consultez le site Internet Leica.

La séchage des lames peut s'effectuer soit directement sur le système BOND en utilisant le protocole *Bake and Dewax, soit séparément dans une étuve ou un incubateur. La température et le temps de séchage conseillés sont les suivants: jusqu'à 16 heures à 56 °C, ou 60 à 120 min à 80 °C.

Mode d'emploi : Dilution et mélange

Les Kreatech FISH probes sont fournies dans un format concentré à 10x et doivent être combinées et diluées à une concentration finale de 1x à l'aide de la BOND Hybridization Solution (AR9037).

Réactif	Volume utilisé (recommandé)
Sonde 1 (10x) - Rouge	1,0 ml
Sonde 2 (10x) - Vert	1,0 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml
Volume total (concentration finale 1x)	10 ml
Nb de tests	Jusqu'à 40 tests

Après dilution de la sonde, le mélange doit être transféré dans un récipient adéquat (récipient de titrage, récipient ouvert de 7 ml BOND ou de 30 ml, en fonction des volumes préparés) et enregistré en tant que « DNA probe» dans le système BOND.
Lors de la préparation de dilutions pour le titrage, veillez à laisser de l'espace pour le volume mort dans le récipient ouvert BOND utilisé (consultez la documentation d'utilisation du système BOND pour connaître les valeurs). Le nombre exact de tests réalisables avec un flacon dépend du volume mort du récipient utilisé et de l'étalonnage du système BOND.
Consultez la rubrique Dépannage en cas d'utilisation de concentrations finales autres que 1x.
Consultez la rubrique « Gestion des réactifs » de votre documentation d'utilisation du système BOND pour obtenir des informations sur l'enregistrement de nouveaux réactifs dans le système BOND (comprend les systèmes BOND-MAX et BOND-III).

FR

Mode d'emploi : Pré-traitement et protocoles

Les Kreatech FISH probes ont été validées à l'aide du BOND FISH kit, des réactifs secondaires BOND et des protocoles de pré-traitement et de coloration BOND indiqués dans le Tableau 2. Le protocole final peut varier en fonction des tissus utilisés par l'opérateur. Tout écart par rapport aux protocoles prescrits doit être validé par l'utilisateur.

Tableau 2 : Protocoles d'utilisation des Kreatech FISH probes

Section du protocole BOND	Nom du protocole	Type du protocole
Staining – ISH Detection	*FISH Protocol D	Lavage post Hybridation
Prestaining – Preparation	*Dewax	Retrait de la paraffine
Prestaining – Heat Pretreatment	HIER 25 min with ER2 (100) (1)	Prétraitement a la chaleur, démasquage de l'épitope
Prestaining – Enzyme Pretreatment	*Enzyme 5 for 35 min (2)	Digestion enzymatique
Prestaining – ISH denaturation	*D10	Dénaturation 10 min.
Prestaining – ISH detection	*ISH Hybridization (12Hr)	Hybridization 12 h.

(1) Ne constitue pas un protocole prédéfini. Pour créer un nouveau protocole, consultez la rubrique « Protocoles » de la documentation d'utilisation du système BOND.

(2) L'enzyme 5 est dérivé de l'Enzyme Concentrate 1 disponible dans le BOND Enzyme Pretreatment Kit (AR9551). Consultez la rubrique Dépannage ci-dessous pour plus de détails.

Schémas de signal

DDIT3 (12q13) Break - XL for BOND peut être utilisé pour détecter les translocations impliquant le gène DDIT3 dans des tissus FFPE.
La sonde a été validée sur des tissus de sarcome selon les protocoles indiqués dans le tableau 2.
DDIT3 (12q13) Break - XL for BOND est conçu comme un dosage à double couleur afin de détecter les translocations de la région du gène DDIT3 à 12q13. Le modèle de signal normal présente deux signaux de fusion rouges/verts (2F) tandis qu'une translocation impliquant le gène DDIT3 produit un signal de fusion pour le chromosome normal 12 et un signal rouge et un signal vert pour la translocation (1F1R1G). En cas d'observation d'autres schémas atypiques, il est conseillé de réaliser des tests supplémentaires.

	Schéma de signal normal gène	Translocation impliquant le gène DDIT3 au niveau de 12q13
Schéma attendu	2F	1F1R1G

Consultez les directives locales ou générales pour l'interprétation des modèles de signaux autres que ceux indiqués dans le tableau.
Avertissement: la performance de DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND a été établie à l'aide des procédures décrites dans la présente notice. Toute modification apportée à ces procédures peut altérer la performance du test. Tout écart par rapport aux protocoles prescrits doit être validé par l'utilisateur.

Stockage et stabilité

Protégez les sondes de toute exposition intense et directe à la lumière. Stockez entre 2 et 8 °C. Dans de telles conditions, le produit intact est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du flacon.
Le réactif non dilué doit être remis dans un environnement de 2 à 8 °C immédiatement après utilisation. Le réactif de sonde dilué/mélangé stocké dans un récipient BOND doit être replacé dans un environnement de 2 à 8 °C après utilisation.
Après dilution de sonde, les mélanges de sonde sont stables pour une durée de 30 jours au plus. Passé ce délai, le mélange dilué peut donner des résultats non optimaux. Aucun signe évident n'indique une contamination et/ou l'instabilité de la sonde.
Toute condition de stockage autre que celles spécifiées ci-dessus doit être vérifiée par l'utilisateur.

Dépannage

Pré-traitement (surdigestion) : Mode d'emploi concernant le système BOND avec l'Enzyme Pretreatment kit (AR9551) il est recommandé d'utiliser une dilution d'1 goutte d'Enzyme Concentrate 1 dans 7 ml de Diluent à enregistrer comme *Enzyme 1 dans le logiciel BOND.
Cet *Enzyme 1 peut être trop fort pour certains spécimens lorsqu'il est utilisé avec le Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) et entraîner une surdigestion des tissus. Une dilution secondaire de l'*Enzyme 1 (dilution jusqu'à 1:300) est conseillée, ainsi qu'un enregistrement distinct du réactif dans le système BOND en tant qu'*Enzyme 5,

afin d'éviter toute confusion. Il est également possible d'utiliser une dilution directe de l'Enzyme concentrate 1 pouvant aller jusqu'à 1:3000 plutôt qu'une dilution en série de l'*Enzyme 1.

Dilution de la sonde et intensité du signal : Une concentration finale à 1x de la sonde est recommandée, mais l'équilibre optimal de la sonde dépend de facteurs tels que l'âge des tissus, la fixation des tissus, le protocole de pré-traitement et la préférence personnelle. Les concentrations optimales et les taux de sonde peuvent varier ; l'utilisateur final les détermine de façon empirique.

Réactif	Volume utilisé (recommandé)	Exemple : Réduire la puissance du signal vert	
Sonde 1 (10x) - Rouge	1,0 ml	Rouge à 1x :	1,0 ml
Sonde 2 (10x) - Vert	1,0 ml	Vert à 0,5x :	0,5 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml		8,5 ml
Volume total à concentration finale 1x	10 ml		10 ml
Nombre de tests	jusqu'à 40 tests		jusqu'à 40 tests

Contactez vos distributeurs locaux ou le Service client local de Leica Biosystems afin de signaler toute coloration inhabituelle.

Limitations spécifiques au produit

Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent accepter d'être responsables de l'interprétation des résultats des patients dans de telles circonstances. Les durées de protocole peuvent varier en raison des variations de types de tissus, de leur fixation et de leur traitement. En outre, la concentration de l'enzyme BOND et la durée d'incubation pourraient nécessiter une optimisation en fonction du type de tissu, ainsi que des conditions de traitement et de fixation.

Informations supplémentaires

Consultez d'autres information concernant l'hybridation *in situ* avec les réactifs BOND dans votre documentation Utilisateur BOND.

Avertissement et précautions :

- Ce produit est strictement réservé au diagnostic *in vitro*
- Réservé à une utilisation en laboratoire/ aux professionnels
- Les Kreatech FISH probes sont destinées à une utilisation avec les systèmes BOND.
- N'utilisez pas les réactifs après la date d'expiration figurant sur l'emballage.
- Portez des vêtements, gants et lunettes/masque de protection adéquats
- Les Kreatech FISH probes contiennent du formamide et doivent par conséquent être enregistrées dans logiciel BOND en tant que

déchets dangereux

- Le formamide peut avoir des effets néfastes sur la reproduction humaine. Évitez toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau sans protection. En cas de contact cutané, rincez avec une grande quantité d'eau pendant au moins 15 minutes.

DANGER

FORMAMIDE

Mentions de danger

H360D Peut nuire au fœtus.

Conseils de prudence généraux

P201 Prendre impérativement connaissance du mode d'emploi spécifique.

P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P308 + P313 En cas d'exposition avérée ou suspectée : consulter un médecin.

P405 À garder sous clef.

P501 Éliminer le contenu/récipient par le biais d'un dispositif agréé réservé aux déchets chimiques ou, si déchets organiques, par incinération à haute température.

- Pour en savoir plus, consultez la fiche de données de sécurité. Pour obtenir un exemplaire de la fiche de données de

sécurité, contactez votre distributeur local ou le bureau Leica Biosystems de votre région. Les fiches de données de sécurité sont disponibles sur le site Internet de Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

- Les spécimens, avant et après fixation et tous les matériaux qui y sont exposés, ainsi que le volume de sonde restant, doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et mis au rebut avec les précautions adéquates.
- Ne pipetez jamais des réactifs avec la bouche et évitez de mettre la peau et les membranes des muqueuses en contact avec des réactifs ou des spécimens
- Si des réactifs ou des spécimens entrent en contact avec des zones sensibles, rincez avec de grandes quantités d'eau. Consultez un médecin
- Nettoyez immédiatement toute substance renversée ou répandue à l'aide de matériaux jetables adaptés.
- Tous les matériaux doivent être éliminés conformément à la législation locale.
- Les étapes de récupération, durées ou températures d'incubation autres que celles indiquées peuvent engendrer des résultats erronés. Tout changement de ce type doit être validé par l'utilisateur

Bibliographie

1. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
2. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue ; proposed guideline. 1991 ; 7(9). Order code M29-P.
3. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In : Wilkinson DG. (ed.) *in situ* Hybridization. A practical approach. 2nd Edition. New York : Oxford University Press, 1998, pp.1 - 13.
4. FISH on BOND User Guide (Guide de l'utilisateur de FISH pour BOND)

Kreatech™ FISH probes
DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND
Katalog-Nr.: KBI-XL015

Verwendungszweck
Zur *In-vitro*-Diagnostik
DDIT3 (12q13) Break - XL for BOND ist zur Verwendung bei Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeproben aus Sarkomen vorgesehen. Die Sonden müssen zusammen mit dem BOND FISH Kit (DS9636) und einem automatischen BONDSystem (einschließlich BOND-MAX System und BOND-III System) verwendet werden.
Die DDIT3 (12q13) Break - XL for BOND FISH Sonde detektiert das DDIT3-Gen betreffende genomische Translokationen in FFPE-Geweben. Die Sonde wurde mit Sarkomgeweben validiert.
Die klinische Bewertung einer Färbung oder des Ausbleibens einer Färbung muss von morphologischen Untersuchungen und angemessenen Kontrollen ergänzt sowie im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und weiterer durch einen qualifizierten Pathologen durchgeführter diagnostischer Tests beurteilt werden.

Zusammenfassung und Erklärung
Kreatech FISH Probes werden zur Durchführung einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bei formalinfixierten, paraffineingebetteten

Gewebe verwendet. Nach angemessener Vorbehandlung, Hybridisierung der Kreatech FISH Probes und gründlicher Post-Hybridisierungs-Waschung mit dem BOND FISH Kit müssen Gewebeschnitte manuell dehydriert und mit DAPI versehen werden. Die Ergebnisse werden durch Fluoreszenzmikroskopie mit den empfohlenen Filtern angemessener Wellenlänge bewertet.

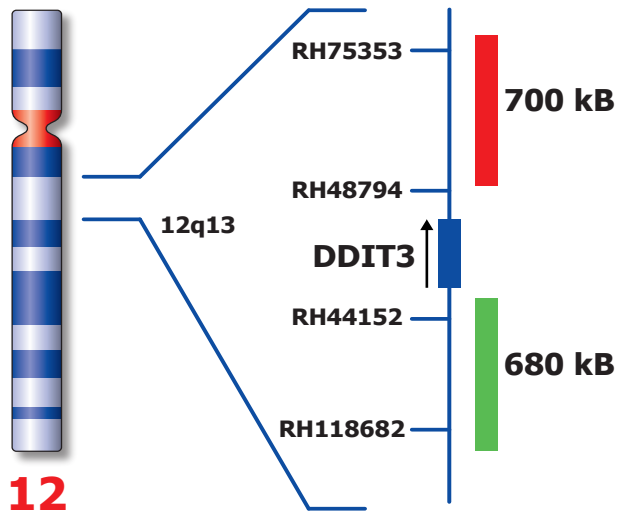
Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

Produkt-beschrei-bung	Produkt-Nr.	Volumen	Zusammensetzung
DDIT3 (12q13) Proximal – XL	pKBI-XL015R	1 ml, 10x Konzentrat	Platinum*Bright*™550 Fluoro-phor-markierte DNA-Sonden in Hybridisierungspuffer. Hybridisierungspuffer enthält < 50 % Formamid
DDIT3 (12q13) Distal – XL	pKBI-XL015G	1 ml, 10x Konzentrat	Platinum*Bright*™495 Fluoro-phor-markierte DNA- Sonden in Hybridisierungspuffer. Hybridisierungspuffer enthält < 50 % Formamid

DDIT3 (12q13) Proximal - XL ist für die Detektion genomischer Regionen proximal zu Bruchstellen in der DDIT3-Genregion optimiert. DDIT3 (12q13) Distal - XL ist für die Detektion genomischer Regionen distal zu Bruchstellen in der DDIT3-Genregion optimiert.
In Kombination werden beide Sonden zur Detektion von Translokationen

eingesetzt, die das DDIT3-Gen bei 12q13 betreffen.

Tabelle 1: Chromosomenkarte mit der Größe der Sonden in Kilo-Basenpaaren (kB), Chromosomenband und genomischer Position nach STS-Markern[1]. Der Pfeil neben dem Gen zeigt die Transkriptionsrichtung des Gens an. In grün DDIT3 (12q13) Distal - XL. In rot DDIT3 (12q13) Proximal - XL. Weitere Informationen zu Chromosomenkarten finden Sie auf der Website von Leica.



1) Karten und Stellen basieren auf dem UCSC Genome Browser, Build GRCh37/hg19, Feb. 2009.

Nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Eine vollständige Liste der zur Probenbehandlung und In-situ-Hybridisierung mit dem BOND System (einschließlich BOND-MAX System und BOND-III System) erforderlichen Materialien können Sie dem Kapitel „Verwendung der BOND Reagenzien“ in der BOND Benutzerdokumentation entnehmen.

Neben den grundlegenden BOND Reagenzien werden speziell zur Analyse von geeignetem Patientenmaterial mit Kreatech FISH Probes und dem BOND System (einschließlich BOND-MAX System und BOND-III System) die folgenden Reagenzien benötigt.

- BOND FISH kit (DS9636)

Kreatech FISH Probes werden mit einem BOND System (einschließlich BOND-MAX System und BOND-III System) zusammen mit dem BOND FISH Kit (DS9636) verwendet. Das BOND FISH Kit ist in Verbindung mit dem *FISH Protocol D, das auf einem BOND System mit BDZ v62 oder höher vorinstalliert ist, für die Testdurchführung mit FISH auf dem BOND System erforderlich. Dieses Protokoll ist als Post-Hybridisierungs-Waschprotokoll gestaltet, um die nicht spezifische Hybridisierung von Nukleinsäuresonden zu verringern. Das BOND FISH Kit enthält den Post-Hybridisierungs-Waschpuffer, ein Kit reicht für 60 Tests aus.

- BOND Hybridization solution (AR9037)

Die Sonden sind in der gewünschten Konzentration unter Verwendung der BOND Hybridization Solution zu verdünnen.

- BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551)

Für optimale FISH Ergebnisse ist eine Enzymverdauung in Kombination mit Wärmevorbehandlung erforderlich.

- DAPI (z. B. LK-095A oder LK-096A)

Eine DAPI-Gegenfärbung wird nicht automatisch mit BOND und dem FISH Protokoll durchgeführt, sondern muss manuell mit der gewünschten Konzentration DAPI Counterstain/Antifade

Sonden

Kreatech FISH Probes wurden an FFPE-Gewebe getestet, das zu ~5 µm zugeschnitten wurde. Gewebeblöcke und -schnitte müssen für optimale Ergebnisse entsprechend den empfohlenen Lagerungs- und Handhabungsbedingungen gelagert werden; siehe hierzu die Website von Leica.

Das Backen kann entweder gemäß dem *Bake and Dewax Protocol mit BOND oder separat in einem Ofen oder Inkubator vorgenommen werden. Die empfohlene Backtemperatur und -dauer beträgt 16 Stunden bei 56 °C oder 60–120 Minuten bei 80 °C.

Gebrauchsanweisung: Verdünnung und Mischen

Kreatech FISH Probes werden 10x konzentriert geliefert und müssen mit der BOND Hybridization Solution (AR9037) auf eine 1x-Endkonzentration kombiniert und verdünnt werden.

Reagenz	Verwendetes Volumen (empfohlen)
Sonde 1 (10x) – Rot	1.0 ml
Sonde 2 (10x) – Grün	1.0 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8.0 ml
Gesamtvolumen bei (1x Endkonzentration)	10 ml
Anzahl	Bis zu 40 Tests

Nach Verdünnung der Sonde muss die Mischung in einen geeigneten BOND Behälter (je nach Volumen Titrationsbehälter, offener 7-ml-Behälter oder offener 30-ml-Behälter) gegeben und im BOND System als „DNA Probe“ registriert werden.

Bei der Vorbereitung von Verdünnungen zur Titration muss das Totvolumen des jeweiligen offenen BOND Behälters beachtet werden (Werte hierzu können Sie der BOND Benutzerdokumentation entnehmen). Die Gesamtzahl an Tests, die mit einer Ampulle durchgeführt werden können, hängt vom Totvolumen des verwendeten Behälters und der Kalibrierung des BOND Systems ab.

Ziehen Sie zur Verwendung von Endkonzentrationen, die von 1x abweichen, den Abschnitt „Fehlerbehebung“ zu Rate.

Informationen zur Registrierung neuer Reagenzien im BOND System (einschließlich BOND-MAX System und BOND-III System) können Sie dem Kapitel „Reagenzienmanagement“ in der BOND Benutzerdokumentation entnehmen.

Gebrauchsanweisung: Vorbehandlung und Protokolle

Kreatech FISH Probes wurden mit dem BOND FISH Kit, den BOND Hilfsreagenzien und den in Tabelle 2 angegebenen BOND Vorbehandlungs- und Färbungsprotokollen validiert. Das Endprotokoll kann sich je nach dem vom Benutzer verwendeten Gewebe unterscheiden. Alle Abweichungen von den vorgeschriebenen Protokollen müssen vom Anwender validiert werden.

Table 2: Protokolle für die Testdurchführung mit Kreatech FISH Probes

BOND Protokoll-abschnitt	Protokollname	Protokolltyp
Staining - ISH Detection	*FISH Protocol D	Post-Hybridisierungs-Waschung
Prestaining - Preparation	*Dewax	Entfernung von Paraffin
Prestaining – Heat Pretreatment	HIER 25 min with ER2 (100) (1)	Wärmevorbehandlung , Epitop-Ruckgewinnüng
Prestaining – Enzyme Pretreatment	*Enzyme 5 for 35 min (2)	Enzymatische Digestion
Prestaining – ISH denaturation	*D10	Denaturierung 10 min.
Prestaining – ISH detection	*ISH Hybridization (12Hr)	Hybridisierung 12 hr.

(1) Kein vordefiniertes Protokoll. Informationen zur Erarbeitung eines neuen Protokolls finden Sie unter „Protokolle“ in der BOND Benutzerdokumentation.

(2) Enzym 5 wird von Enzyme Concentrate 1 abgeleitet, welches im BOND Enzyme Pretreatment Kit (AR9551) enthalten ist. Detaillierte Informationen finden Sie im Abschnitt „Fehlerbehebung“ weiter unten.

Signalmuster

DDIT3 (12q13) Break - XL for BOND kann zur Detektion von das DDIT3-Gen betreffenden Translokationen in FFPE-Geweben eingesetzt werden. Die Sonde wurde mit Sarkom-Geweben nach den in Tabelle 2 aufgeführten Protokollen validiert.

DDIT3 (12q13) Break - XL for BOND ist als Zwei-Farben-Assay

zur Detektion von Translokationen der DDIT3-Genregion bei 12q13 konzipiert. Das normale Signalmuster zeigt zwei rot/grüne Fusionssignale (2F), während eine das DDIT3-Gen betreffende Translokation zu einem Fusionssignal für das normale Chromosom 12 sowie einem roten und einem grünen Signal für die Translokation (1F1R1G) führt.
Weiterführende Tests sind ratsam, wenn andere, untypische Muster auftreten.

	Normales Signalmuster	Translokation in Verbindung mit dem DDIT3-Gen bei 12q13
Erwartetes Muster	2F	1F1R1G

Beachten Sie die örtlichen oder allgemeinen Richtlinien für die Interpretation von Signalmustern, die nicht in der Tabelle aufgeführt sind.
Wichtiger Hinweis: Die Leistung von DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND wurde anhand der in dieser Packungsbeilage beschriebenen Verfahren bewertet. Änderungen an diesen Verfahren können sich auf die Leistung des Tests auswirken. Alle Abweichungen von den vorgeschriebenen Protokollen müssen vom Anwender validiert werden.

Lagerung und Haltbarkeit

Sonden vor starker und direkter Lichteinstrahlung schützen.
Bei 2 - 8 °C lagern. Das ungeöffnete Produkt ist unter diesen

Bedingungen bis zu dem auf dem Ampullenetikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
Unverdünnte Reagenzien müssen direkt nach der Verwendung wieder bei 2 - 8 °C eingelagert werden. Verdünnte/gemischte Sondenreagenzien, die in einem BOND Behälter aufbewahrt werden, müssen nach der Verwendung wieder bei 2 - 8 °C gelagert werden. Nach der Sondenverdünnung sind Sondengemische mindestens 30 Tage lang stabil. Nach diesem Zeitraum können bei Verwendung der verdünnten Mischung suboptimale Ergebnisse auftreten.
Es gibt keine offensichtlichen Zeichen, die auf eine Kontaminierung und/oder Instabilität der Sonde hinweisen. Lagerbedingungen, die von den oben angegebenen abweichen, müssen vom Anwender verifiziert werden.

Fehlerbehebung

Vorbehandlung (Überverdauung): In der Gebrauchsanweisung für BOND Enzyme Pretreatment Kit (AR9551) wird empfohlen, eine Verdünnung mit 1 Tropfen Enzyme Concentrate 1 in 7 ml Diluent als*Enzyme 1 in der BOND Software zu registrieren.
Dieses *Enzyme 1 ist unter Umständen bei Verwendung in Kombination mit Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) zu stark für bestimmte Sonden und führt zu einer Überverdauung des Gewebes. Um Unklarheiten zu vermeiden, werden sowohl eine zweite Verdünnung von *Enzyme 1 (Verdünnung bis zu 1:300) als auch eine separate Registrierung des Reagenzes im BOND System als *Enzyme 5 empfohlen. Alternativ kann

eine direkte Verdünnung von Enzyme Concentrate 1 auf bis zu 1:3000 anstatt einer seriellen Verdünnung von *Enzyme 1 durchgeführt werden. Sondenverdünnung und Signalintensität: Eine endgültige Sondenkonzentration von 1x wird zur Verwendung empfohlen, die optimale Sondenbalance hängt jedoch von Faktoren wie dem Gewebealter, der Gewebefixierung, de Vorbehandlungsprotokoll und den Präferenzen des Anwenders ab. Optimale Konzentrationen und Sondenverhältnisse können schwanken und müssen vom Endanwender empirisch bestimmt werden.

Reagenz	Verwendetes Volumen (empfohlen)	Beispiel: Verringerung der Stärke des grünen Signals	
Sonde 1 (10x) – Rot	1,0 ml	Rot bei 1x:	1,0 ml
Sonde 2 (10x) – Grün	1,0 ml	Grün bei 0,5x:	0,5 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml		8,5 ml
Gesamtvolumen bei Endkonzentration 1x	10 ml		10 ml
Anzahl der Tests	Bis zu 40 Tests		Bis zu 40 Tests

Wenden Sie sich bei ungewöhnlichen Färbungen an Ihren Vertriebshändler vor Ort oder den Kundendienst der zuständigen

Vertretung von Leica Biosystems.

Produktspezifische Beschränkungen

Anwender, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, nehmen die Verantwortung für die Beurteilung der Patientenergebnisse unter diesen Umständen auf sich. Die Protokollzeiten können aufgrund von Unterschieden im Gewebetyp, der Fixierung und der Verarbeitung schwanken. Zudem kann für die BOND Enzym-Konzentrierungs- und Inkubationszeiten abhängig von Gewebetyp, Verarbeitung und Fixierungsbedingungen eine Optimierung erforderlich sein.

Weitere Informationen

Weitere Informationen zur In-situ-Hybridisierung mit BOND Reagenzien finden Sie in der BOND Benutzerdokumentation.

Warn- und Vorsichtshinweise

- Dieses Produkt ist nur zur In-Vitro-Diagnostik bestimmt.
- Nur für Labor-/berufliche Zwecke.
- Kreatech FISH Probes sind für die Verwendung auf BOND Systemen bestimmt.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Verpackungsetikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/ Gesichtsschutz tragen.
- Kreatech FISH Probes enthalten Formamid und müssen

dementsprechend in der BOND Software als gefährlicher Abfall registriert werden.

- Formamid kann für die menschliche Fortpflanzung schädlich sein. Einatmen, Verschlucken und Kontakt mit ungeschützter Haut vermeiden. Bei Hautkontakt mit reichlich Wasser mindestens 15 Minuten lang waschen.

GEFAHR

FORMAMIDE

Gefahrenhinweise

H360D Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

SICHERHEITSHINWEISE

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen**.**

P308+P313 BEI Exposition oder falls betroffen Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P405 Unter Verschluss aufbewahren.

P501 Inhalt und Behälter sind in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Bestimmungen zu entsorgen.

Vollständige Informationen dazu finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

Das Sicherheitsdatenblatt erhalten Sie von Ihrem Vertriebshändler vor Ort oder der zuständigen Vertretung von Leica Biosystems.
Sicherheitsdatenblätter sind auf der Website von Leica Biosystems unter www.LeicaBiosystems.com erhältlich.

- Sonden vor und nach der Fixierung, alle Materialien, die mit ihnen in Kontakt kommen, sowie überständiges Sondenvolumen müssen als potenziell infektiös behandelt und dementsprechend unter Beachtung der entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden.
- Reagenzien niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt mit der Haut sowie den Kontakt der Schleimhäute mit Reagenzien oder Proben vermeiden.
- Bei Kontakt von Reagenzien oder Sonden mit empfindlichen Bereichen mit reichlich Wasser abwaschen. Medizinischen Ratschlag einholen.
- Verschüttetes Material sofort mit geeigneten Materialien aufwischen.
- Alle Materialien müssen in Übereinstimmung mit den lokal geltenden Vorschriften entsorgt werden.
- Rückgewinnungsschritte, Inkubationszeiten und Temperaturen, die von den Angaben abweichen, können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Alle solche Änderungen müssen vom Anwender validiert werden.

Bibliographie

1. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
2. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Stan-

dards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.

3. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *in situ* Hybridization. A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.1 - 13.
4. FISH on BOND User Guide (Bedienungsanleitung zu FISH auf BOND)

Kreatech™ FISH probes
DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND
N. catalogo: KBI-XL015

Uso previsto

Per uso diagnostico *in vitro*
DDIT3 (12q13) Break - XL per BOND è destinato all'utilizzo su sezioni tissutali di sarcoma fissate in formalina e incluse in paraffina (FFPE). Le sonde devono essere utilizzate in combinazione con il BOND FISH Kit (DS9636) su un sistema automatizzato BOND (comprende il sistema BOND-MAX e il sistema BOND-III).
La sonda DDIT3 (12q13) Break - XL per BOND FISH rivela le traslocazioni genomiche che coinvolgono il gene DDIT3 in tessuti FFPE. La sonda è stata validata su tessuti di sarcoma.
L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione, o della sua assenza, deve essere integrata da studi morfologici e controlli adeguati, e deve essere valutata nel contesto dell'anamnesi del paziente e di altri test diagnostici, da parte di un patologo qualificato.

Riepilogo e spiegazione

Le Kreatech FISH probes vengono usate per eseguire una procedura di colorazione tramite ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) su tessuti fissati con formalina e inclusi in paraffina. Dopo un adeguato pretrattamento, l'ibridazione delle Kreatech FISH probes e un accurato

lavaggio post-ibridazione mediante il BOND FISH kit, le sezioni tissutali devono essere disidratate manualmente e montate con DAPI. I risultati sono interpretati mediante microscopia a fluorescenza con l'uso dei filtri raccomandati per le lunghezze d'onda appropriate.

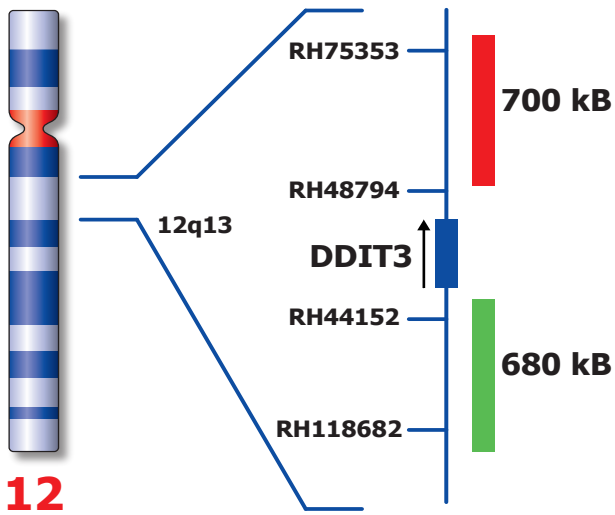
Reagenti forniti

Descrizione del prodotto	Codice prodotto	Volume	Composizione
DDIT3 (12q13) Proximal – XL	pKBI-XL015R	1 ml, 10 x concentrato	Sonde Platinum*Bright*™550 per DNA marcate con fluoroforo in tampone di ibridazione. Il tampone di ibridazione contiene Formammide a <50%
DDIT3 (12q13) Distal – XL	pKBI-XL015G	1 ml, 10 x concentrato	Sonde Platinum*Bright*™495 per DNA marcate con fluoroforo in tampone di ibridazione. Il tampone di ibridazione contiene Formammide a <50%

DDIT3 (12q13) Proximal - XL è ottimizzato per rilevare le regioni genomiche prossimali rispetto ai breakpoint nella regione del gene DDIT3 su 12q13.
DDIT3 (12q13) Distal - XL è ottimizzato per rilevare le regioni genomiche distali rispetto ai breakpoint nella regione del gene DDIT3.
Le due sonde insieme sono impiegate per rilevare le traslocazioni che

coinvolgono il gene DDIT3 su 12q13.

Tabelle 1: Mappa cromosomica che mostra le dimensioni delle sonde in kilobasepair (kB), la banda cromosomica e la posizione del genoma definiti dai marcatori STS[1]. La freccia adiacente al gene indica la direzione di trascrizione del gene. DDIT3 (12q13) Distal - XL in verde. DDIT3 (12q13) Proximal - XL in rosso. Consultare il sito web di Leica per ulteriori informazioni sulle mappe cromosomiche.



1) Mapper e posizioni sono basate su UCSC genome browser, build GRCh37/hg19, Feb.2009.

Materiali richiesti ma non forniti

Fare riferimento a “Utilizzo dei reagenti BOND” nella documentazione per l'utente di BOND per un elenco completo dei materiali richiesti per il trattamento dei campioni e per l'ibridazione *in situ* usando il sistema BOND (include il sistema BOND-MAX e il sistema BOND-III).

Oltre ai reagenti BOND generici, i seguenti reagenti sono richiesti specificatamente per l'analisi dei campioni adeguati dei pazienti per mezzo delle Kreatech FISH probes sul sistema BOND (include il sistema BOND-MAX e il sistema BOND-III).

- BOND FISH kit (DS9636)

Le Kreatech FISH probes vengono utilizzate su un sistema BOND (include il sistema BOND-MAX e il sistema BOND-III) in combinazione con il BOND FISH kit (DS9636). Il BOND FISH kit in combinazione con *FISH Protocol D, preinstallato sul sistema BOND con BDZ v62 o versione successiva, è necessario per l'esecuzione di FISH sul sistema BOND. Questo protocollo è stato progettato come protocollo di lavaggio post-ibridazione, per ridurre l'ibridazione non specifica delle sonde di acido nucleico. Il BOND FISH kit contiene il buffer di lavaggio post-ibridazione e un unico kit è sufficiente per 60 test.

- BOND Hybridization solution (AR9037)

Le sonde devono essere diluite per portarle alla concentrazione desiderata utilizzando la BOND Hybridization solution.

- BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551)

Per ottenere risultati FISH ottimali è richiesta la digestione con enzima combinata con un pretrattamento termico.

- DAPI (es. LK-095A o LK-096A)

La colorazione di contrasto DAPI non viene eseguita automaticamente nell'ambito del protocollo FISH su BOND e viene eseguita manualmente usando la concentrazione desiderata di DAPI counterstain / antifade.

Campioni

Le Kreatech FISH probes per BOND sono state verificate su tessuti FFPE tagliati a ~5 µm. Per ottenere risultati ottimali, i blocchi di tessuto e i vetrini tagliati devono essere conservati secondo le indicazioni per la conservazione e la manipolazione, riportate sul sito web di Leica.

L'asciugatura può essere eseguita sul sistema BOND utilizzando il *Bake and Dewax protocol, o separatamente in stufa o incubatrice. Il tempo e la temperatura di asciugatura raccomandati sono fino a 16 ore a 56 °C o 60 - 120 min a 80 °C.

Istruzioni per l'uso: Diluizione e miscelazione

Le Kreatech FISH probes sono fornite in formato concentrato 10x e devono essere combinate e diluite alla concentrazione finale 1x usando la BOND Hybridization Solution (AR9037).

Reagente	Volume utilizzato (consigliato)
Sonda 1 (10x) - Rosso	1,0 ml
Sonda 2 (10x) - Verde	1,0 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml
Volume totale (alla concentrazione finale 1x)	10 ml
Numero test	Fino a 40 test

Dopo la diluizione della sonda, la miscela deve essere trasferita in un contenitore BOND appropriato (contenitore di titolazione, contenitore aperto da 7 ml o contenitore aperto da 30 ml, in funzione dei volumi preparati) e registrato come “DNA probe” nel sistema BOND.
Durante la preparazione delle diluizioni per la titolazione, assicurarsi di tener conto del volume inattivo del relativo BOND Open Container (per i valori fare riferimento alla documentazione per l'utente del sistema BOND). Il numero esatto di test eseguibili con un flacone dipende dal volume inattivo del contenitore utilizzato e dalla calibrazione dello strumento BOND.
Vedere la sezione relativa alla Risoluzione dei problemi per l'uso di concentrazioni finali diverse da 1x.
Fare riferimento a “Gestione del reagente” nella documentazione per l'utente del sistema BOND per informazioni sulla registrazione di nuovi reagenti sul sistema BOND (comprende il sistema BOND-MAX e il sistema BOND-III).

Istruzioni per l'uso: Pretrattamento e protocolli

Le Kreatech FISH probes sono state convalidate usando il BOND FISH kit, i reagenti ausiliari BOND e i protocolli pretrattamento e colorazione BOND predefiniti, mostrati nella Tabella 2. Il protocollo finale può variare in base al tessuto utilizzato dall'utente. Qualsiasi deviazione dai protocolli prescritti deve essere convalidata dall'utente.

Table 2: Protocolli per l'uso delle Kreatech FISH probes

Sezione del protocollo BOND	Nome del protocollo	Tipo di protocollo
Staining - ISH Detection	*FISH Protocol D	Post ibridiazione lavaggio
Prestaining - Preparation	*Dewax	Rimozione della paraffina
Prestaining – Heat Pretreatment	HIER 25 min with ER2 (100) (1)	Pretrettamento termico , Recupero antigenico
Prestaining – Enzyme Pretreatment	*Enzyme 5 for 35 min (2)	Digestione enzimatica
Prestaining – ISH denaturation	*D10	Denaturazione 10 min.
Prestaining – ISH detection	*ISH Hybridization (12Hr)	Ibridazione 12 ore.

(1) Non è un protocollo predefinito. Per la creazione di un nuovo protocollo, fare riferimento a "Protocolli" nella documentazione per l'utente BOND.

(2) L'enzima 5 è derivato da Enzyme Concentrate 1 disponibile nel BOND Enzyme Pretreatment Kit (AR9551). Vedere più avanti la sezione Risoluzione dei problemi per i casi particolari.

Schemi di segnale

DDIT3 (12q13) Break - XL per BOND può essere utilizzato per rilevare le traslocazioni che coinvolgono il gene DDIT3 in tessuti FFPE. La sonda è stata validata su tessuti di sarcoma utilizzando i protocolli indicati in tabella 2.

DDIT3 (12q13) Break - XL per BOND è progettato come un saggio a due colori per rilevare le traslocazioni della regione del gene DDIT3 su 12q13. Il normale pattern di segnali è costituito da due segnali di fusione rosso/verde (2F), mentre le traslocazioni che coinvolgono il gene DDIT3 generano un segnale di fusione per il cromosoma normale 12 e un segnale rosso e un segnale verde per la traslocazione (1F1R1G).

Si consiglia una verifica supplementare se vengono osservate strutture diverse e atipiche.

	Schema normale del segnale	Traslocacioni che interessa il gene DDIT3 in 12q13
Schema previsto	2F	1F1R1G

Consultare le linee guida locali o generali per l'interpretazione di schemi di segnali diversi da quelli indicati nella tabella.

Dichiarazione di non responsabilità: Le prestazioni della sonda DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND sono state stabilite usando la procedura descritta nel presente inserto incluso nella confezione. Qualsiasi modifica apportata a queste procedure può modificare le prestazioni

dell'analisi. Qualsiasi deviazione dai protocolli indicati deve essere convalidata dall'utente.

Stoccaggio e stabilità

Proteggere le sonde dalla luce forte e diretta.
Conservare a 2 - 8 °C. Il prodotto non ancora aperto è stabile in queste condizioni fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del flacone.
Riportare il reagente non diluito a 2 - 8 °C immediatamente dopo l'uso.
Il reagente della sonda diluito/miscelato conservato in un contenitore BOND deve essere riportato a 2 - 8 °C dopo la sessione di analisi.
Dopo la diluizione della sonda, le miscele delle sonde sono stabili per almeno 30 giorni. Dopo questo periodo di tempo, la miscela diluita potrebbe generare risultati inferiori a quelli ottimali. Non c'è alcun segno evidente che indica contaminazione e/o instabilità della sonda.
Condizioni di stoccaggio diverse da quelle specificate in precedenza devono essere verificate dall'utente.

Risoluzione dei problemi

Pretrattamento (sovradigestione): Le istruzioni per uso del BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551) raccomandano una diluizione di 1 goccia di Enzyme Concentrate 1 in 7 ml di Diluent da registrare come *Enzyme 1 nel software BOND.
Questo *Enzyme 1 potrebbe essere troppo forte se utilizzato in combinazione con HIER (Heat Induced Epitope Retrieval) e portare a una sovradigestione del tessuto. Una diluizione secondaria

dell'*Enzyme 1 (fino a una diluizione 1:300) è raccomandata, insieme a una registrazione separata del reagente nel sistema BOND come *Enzyme 5, per evitare confusioni. Alternativamente, può essere utilizzata una diluizione diretta fino a 1:3000 dell'Enzyme concentrate 1, al posto della diluizione seriale di *Enzyme 1.

Diluizione della sonda e intensità del segnale: Si raccomanda per l'uso una concentrazione finale 1x della sonda ma il bilanciamento ottimale della sonda dipende da fattori come l'età del tessuto, il fissaggio del tessuto, il protocollo di pretrattamento, oltre alle preferenze personali. Le concentrazioni ottimali e i rapporti delle sonde possono variare e devono essere determinati empiricamente dall'utente finale.

Reagente	Volume utilizzato (consigliato)	Esempio: Riduzione dell'intensità del segnale Verde	
Sonda 1 (10x) - Rosso	1,0 ml	Rosso a 1x:	1,0 ml
Sonda 2 (10x) - Verde	1,0 ml	Verde a 0,5x:	0,5 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml		8,5 ml
Volume totale alla concentrazione finale 1x	10 ml		10 ml
Numero di test	fino a 40 test		fino a 40 test

Contattare il distributore locale o l'assistenza clienti dell'ufficio regionale di Leica Biosystems per segnalare qualsiasi colorazione insolita.

Limitazioni specifiche del prodotto

Gli utenti che si allontanano dalle procedure di test consigliate devono accettare la responsabilità dell'interpretazione dei risultati dei pazienti in tali circostanze. I tempi dei protocollo possono variare a causa dei diversi tipi di tessuto, del fissaggio e del trattamento. Inoltre, la concentrazione e il tempo di incubazione dell'enzima BOND possono richiedere un'ottimizzazione a seconda del tipo di tessuto, del trattamento e delle condizioni di fissaggio.

Ulteriori informazioni

Ulteriori informazioni sull'ibridazione *in situ* con i reagenti BOND sono reperibili nella documentazione per l'utente BOND.

Avvertenze e precauzioni

- Questo prodotto è destinato solo per l'uso diagnostico *in vitro*
- Solo per uso di laboratorio / professionale
- Le Kreatech FISH probes sono destinate all'uso sui sistemi BOND.
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione
- Indossare un abbigliamento protettivo adatto, guanti e protezioni per occhi/volto

- Le Kreatech FISH probes contengono formammide e devono quindi essere registrate nel software BOND come rifiuto pericoloso
- La formammide può avere effetti dannosi per la riproduzione umana. Evitare l'inspirazione, l'ingestione e il contatto con la pelle non protetta. In caso di contatto con la pelle, lavare con abbondante acqua per almeno 15 minuti

PERICOLO

FORMAMIDE

Dichiarazioni di pericolo

H360D Può arrecare danni fetali.

Dichiarazioni precauzionali

P201 Prima dell'uso, procurarsi le istruzioni speciali.

P280 Indossare guanti protettivi/abbigliamento protettivo/protezione per occhi e volto.

P308+P313 In caso di esposizione o dubbi: Consultare un medico / farsi visitare.

P405 Conservare in un ambiente chiuso a chiave.

P501 Smaltire il contenuto/contenitore in una discarica autorizzata per prodotti chimici o, se organico, in un inceneritore ad alta temperatura.

- Consultare la SDS per i dettagli completi. Per ottenere una copia della Scheda Dati di Sicurezza, contattare il distributore

locale o l'ufficio regionale di Leica Biosystems. Le Schede Dati di Sicurezza sono disponibili sul sito web di Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

- I campioni, prima e dopo il fissaggio, e tutti i materiali esposti a essi, oltre al volume residuo della sonda, devono essere maneggiati come materiali in grado di trasmettere infezioni e smaltiti con le dovute precauzioni
- Non pipettare mai i reagenti con la bocca ed evitare il contatto con la cute e le mucose dei reagenti o dei campioni
- Se i reagenti o i campioni dovessero venire a contatto con aree sensibili, lavare con acqua abbondante. Consultare un medico
- Pulire immediatamente i versamenti utilizzando materiali monouso adeguati
- Tutti i materiali devono essere smaltiti in conformità alle leggi del luogo.
- Fasi di recupero, tempi di incubazione e temperature diversi da quelli specificati possono condurre a risultati erronei. Qualsiasi variazione in materia deve essere convalidata dall'utente

IT

Bibliografia

1. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
2. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed

guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
3. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *in situ* Hybridization. A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.1 - 13.
4. FISH on BOND User Guide (Guida per l'utente di FISH su BOND)

Kreatech™ FISH probes
DDIT3 (12q13) Break– XL for BOND

N.º de catálogo: KBI-XL015

Uso previsto

Para uso diagnóstico *in vitro*

DDIT3 (12q13) Break - XL para BOND está prevista para su uso en secciones de tejido de sarcoma fijados en formol e incluidos en parafina (FFPE). Las sondas se deben usar junto con el BOND FISH Kit (DS9636) en un sistema BOND automatizado (incluye los sistemas BOND-MAX y BOND-III).

La sonda DDIT3 (12q13) Break - XL para BOND FISH detecta las translocaciones genómicas que afectan al gen DDIT3 en tejidos FFPE. La sonda se ha validado en tejidos de sarcoma.

La interpretación clínica de cualquier tinción o su ausencia se debe complementar con estudios morfológicos y controles adecuados, y un patólogo cualificado la debe evaluar en el contexto de la historia clínica del paciente y otras pruebas diagnósticas.

Resumen y explicación

Las sondas Kreatech FISH probes se utilizan para realizar un procedimiento de tinción mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés) en tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina. Tras un pretratamiento adecuado, la hibridación de las sondas Kreatech FISH probes y el lavado astringente tras la

hibridación usando el BOND FISH kit, los cortes de tejidos se deben deshidratar y montar con DAPI manualmente. Los resultados se interpretan mediante microscopía de fluorescencia usando los filtros recomendados con las longitudes de onda adecuadas.

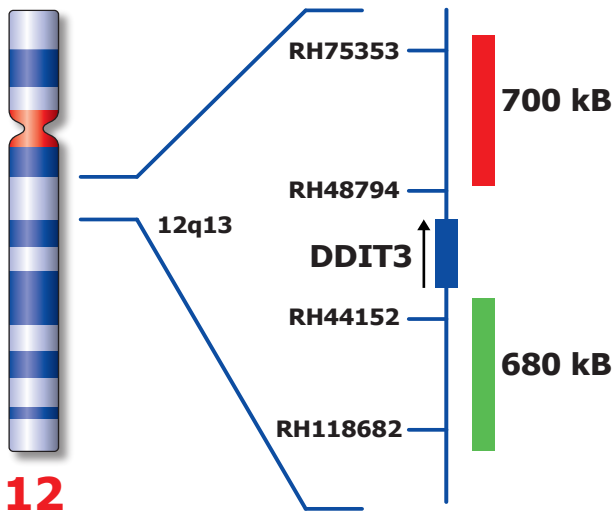
Reactivos proporcionados

Descripción del producto	N.º de producto	Volumen	Composición
DDIT3 (12q13) Proximal – XL	pKBI-XL015R	1 ml, concentración de 10 x	Las sondas de ADN Platinum*Bright*™ 550 etiquetadas con fluoróforo en tampón de hibridación. El tampón de hibridación contiene formamida al 50%
DDIT3 (12q13) Distal – XL	pKBI-XL015G	1 ml, concentración de 10 x	Las sondas de ADN Platinum*Bright*™ 495 etiquetadas con fluoróforo en tampón de hibridación. El tampón de hibridación contiene formamida al 50 %.

DDIT3 (12q13) Proximal - XL se ha optimizado para detectar las regiones genómicas proximales a los puntos de rotura en la región del gen DDIT3.
DDIT3 (12q13) Distal - XL se ha optimizado para detectar las regiones genómicas distales a los puntos de rotura en la región del gen DDIT3. Ambas sondas se usan en combinación para detectar las

translocaciones que afectan al gen DDIT3 en 12q13.

Tabla 1: Mapas cromosómicos en los que se muestran el tamaño de las sondas en kilopares de bases (kB), la banda cromosómica y la posición genómica definida por los marcadores STS[1]. La flecha situada junto al gen indica la dirección de transcripción del gen. En verde DDIT3 (12q13) Distal - XL. En rojo DDIT3 (12q13) Proximal - XL. Consulte el sitio web de Leica para obtener más información sobre los mapas cromosómicos.



1) Los mapas y las ubicaciones se basan en UCSC genome browser, build GRCh37/hg19, Feb.2009.

Material necesario que no se suministra

Consulte la sección “Uso de los reactivos BOND” de la documentación del usuario del sistema BOND para obtener una lista completa de los materiales necesarios para el tratamiento de muestras y la hibridación *in situ* usando el sistema BOND (incluye los sistemas BOND-MAX y BOND-III).

Además de los reactivos BOND genéricos, los reactivos siguientes son necesarios específicamente para el análisis del material del paciente adecuado con sondas Kreatech FISH probes en el sistema BOND (incluye los sistemas BOND-MAX y BOND-III).

- BOND FISH kit (DS9636)

Las sondas Kreatech FISH probes se procesan en un sistema BOND (incluye los sistemas BOND-MAX y BOND-III) en combinación con el BOND FISH kit (DS9636). El BOND FISH kit, en combinación con el *FISH Protocol D, instalado previamente en el sistema BOND con BDZ v62 o superior, es necesario para el procesamiento de FISH en el sistema BOND. Este protocolo se ha diseñado para el lavado tras la hibridación, con el fin de reducir la hibridación no específica de las sondas de ácido nucleico. El BOND FISH kit contiene el tampón de lavado tras la hibridación; un kit es suficiente para realizar 60 pruebas.

- BOND Hybridization solution (AR9037)

Las sondas se deben diluir a la concentración preferida usando la BOND Hybridization solution.

- BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551)

Es preciso realizar la digestión enzimática en combinación con un

pretratamiento térmico para obtener resultados óptimos con FISH.

- DAPI (p. ej., LK-095A o LK-096A)

La contratinción DAPI no se lleva a cabo automáticamente como parte del protocolo FISH en el sistema BOND, por lo que se tiene que realizar manualmente usando la concentración preferida de DAPI counterstain / antifade.

Muestras

Las sondas Kreatech FISH probes se han analizado con tejidos FFPE con un grosor de ~ 5 µm. Para obtener resultados óptimos, los bloques y los portaobjetos cortados de tejidos se deben almacenar de acuerdo con las condiciones recomendadas de almacenamiento y manipulación. Consulte el sitio web de Leica.

El termoendurecimiento se puede realizar en el sistema BOND con el *Bake and Dewax protocol o bien por separado en un horno o una incubadora. La temperatura y el tiempo recomendados para el termoendurecimiento es de hasta 16 horas a 56 °C o de 60-120 minutos a 80 °C.

Instrucciones de uso: dilución y mezclado

Las sondas Kreatech FISH probes se suministran a una concentración 10 x y se deben combinar y diluir para obtener una concentración final 1 x usando BOND Hybridization solution (AR9037).

Reactivo	Volumen usado (recomendado)
Sonda 1 (10 x) - rojo	1,0 ml
Sonda 2 (10 x) - verde	1,0 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml
Volumen total a una concentración final 1 x	10 ml
N.º de pruebas	Hasta 40 pruebas

Tras la dilución de la sonda, la mezcla se debe transferir a un contenedor BOND adecuado (contenedor de titulación, contenedor abierto de 7 ml o contenedor abierto de 30 ml, dependiendo de los volúmenes preparados) y registrar como “DNA probe” en el sistema BOND.

Cuando prepare diluciones para la valoración, asegúrese de que obtiene cantidad suficiente para el volumen muerto del BOND Open Container adecuado (consulte los valores de la documentación del usuario del sistema BOND). El número exacto de pruebas de un vial depende del volumen muerto del contenedor usado y la calibración del sistema BOND.

Consulte en la sección “Solución de problemas” el uso de concentraciones finales diferentes a 1 x.

Consulte la sección “Gestión de reactivos” de la documentación del usuario del sistema BOND para obtener más información sobre el registro de reactivos nuevos en el sistema BOND (incluye los sistemas BOND-MAX y BOND-III).

Instrucciones de uso: pretratamiento y protocolos

Las sondas Kreatech FISH probes se han validado usando el BOND FISH kit, reactivos complementarios BOND y los protocolos predeterminados de pretratamiento y tinción BOND mostrados en la tabla 2. El protocolo final puede variar en función del tejido empleado por el usuario. El usuario debe validar cualquier desviación de los protocolos indicados.

Tabla 2: protocolos para procesar las sondas Kreatech FISH probes

Parte del protocolo BOND	Nombre del protocolo	Tipo de protocolo
Staining – ISH Detection	*FISH Protocol D	Lavado tras la hibridación
Prestaining – Preparation	*Dewax	Eliminación de la parafina
Prestaining – Heat Pretreatment	HIER 25 min with ER2 (100) (1)	Pretratamiento térmico, Recuperación del epítopo
Prestaining – Enzyme Pretreatment	Enzyme 5 for 35 min (2)	Digestión enzimática
Prestaining – ISH denaturation	*D10	Desnaturalización durante 10 minutos.
Prestaining – ISH detection	*ISH Hybridization (12Hr)	Hibridación durante 12

(1) No se trata de un protocolo predefinido. Para crear un protocolo nuevo, consulte la sección “Protocolos” de la documentación del usuario del sistema BOND.

(2) La enzima 5 se deriva del Enzyme Concentrate 1 disponible en el BOND Enzyme Pretreatment Kit (AR9551). Consulte información más detallada en la sección “Solución de problemas”.

Patrones de las señales

DDIT3 (12q13) Break - XL para BOND puede usarse para detectar las translocaciones que afectan al gen DDIT3 en tejidos FFPE. La sonda se ha validado en tejidos de sarcoma usando los protocolos de la tabla 2.

DDIT3 (12q13) Break - XL para BOND se ha diseñado como un ensayo

de dos colores para detectar las translocaciones de la región del gen DDIT3 en 12q13. El patrón de señal normal muestra dos señales de fusión rojas/verdes (2F), mientras que una translocación que afecta al gen DDIT3 genera una señal de fusión para el cromosoma 12 normal, y una señal roja y otra verde para la translocación (1F1R1G).
Se recomienda realizar pruebas de seguimiento si se observan patrones atípicos.

	Patrón normal de las señales	Traslocación asociada al gen DDIT3 en 12q13
Patrón esperado	2F	1F1R1G

Consulte las pautas locales o generales para la interpretación de patrones de señal distintos a los mostrados en la tabla.

Exención de responsabilidad: El rendimiento de la sonda DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND se ha establecido usando los procedimientos descritos en este folleto. Si se modifican estos procedimientos, se puede alterar el rendimiento del ensayo. El usuario debe validar cualquier desviación de los protocolos indicados.

Almacenamiento y estabilidad

Proteja las sondas de la luz directa intensa.
Almacénese a una temperatura de 2 - 8 °C. El producto sin abrir se mantiene estable en estas condiciones hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. Vuelva a conservar a una temperatura

de 2 - 8 °C el reactivo no diluido inmediatamente tras el uso. El reactivo de la sonda diluido/mezclado almacenado en un contenedor BOND se debe volver a conservar a una temperatura de 2 - 8 °C tras haberlo procesado.
Tras la dilución de la sonda, las mezclas de sondas se mantienen estables durante 30 días. Una vez transcurrido este periodo, la mezcla diluida puede causar resultados incorrectos. No hay indicios evidentes que indiquen la contaminación y/o la inestabilidad de la sonda. El usuario debe verificar las condiciones de almacenamiento diferentes a las indicadas anteriormente.

Solución de problemas

Pretratamiento (sobredigestión): en las instrucciones de uso del BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551) se recomienda que se registre una dilución de 1 gota de Enzyme Concentrate 1 en 7 ml de Diluent como *Enzyme 1 en el software BOND.
Esta *Enzyme 1 puede ser demasiado potente para determinadas muestras cuando se usa en combinación con Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) y tiene como consecuencia un tejido digerido en exceso. Se recomienda realizar una dilución secundaria de *Enzyme 1 (una dilución de hasta 1:300) y un registro independiente del reactivo en el sistema BOND como *Enzyme 5 para evitar confusiones. Como alternativa, se puede usar una dilución directa de hasta 1:3000 del Enzyme concentrate 1 en lugar de la dilución sucesiva de *Enzyme 1.
Dilución de la sonda e intensidad de la señal: se recomienda una

concentración final de la sonda 1 x, sin embargo, el equilibrio adecuado de la sonda depende de factores como la edad y la fijación del tejido, el protocolo de pretratamiento y las preferencias personales. Las concentraciones óptimas y las relaciones de la sonda pueden variar, y el usuario final las debe determinar de forma práctica.

Reactivo	Volumen usado (recomendado)	Ejemplo: reducir la potencia de la señal verde	
Sonda 1 (10 x) - rojo	1,0 ml	Roja a 1 x:	1,0 ml
Sonda 2 (10 x) - verde	1,0 ml	Verde a 0,5 x:	0,5 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml		8,5 ml
Volumen total a una concentración final 1 x	10 ml		10 ml
Número de pruebas	hasta 40 pruebas		hasta 40 pruebas

Póngase en contacto con su distribuidor local o el Servicio de atención al cliente de la oficina regional de Leica Biosystems para comunicar cualquier tinción anormal.

Limitaciones específicas del producto

Los usuarios que se desvían de los procedimientos de prueba recomendados tienen que responsabilizarse de la interpretación de los resultados de los pacientes en estas circunstancias. Los tiempos de los protocolos pueden variar debido a las variaciones de los tipos de tejido, fijación y procesamiento. Además, es posible que la concentración y el tiempo de incubación de las enzimas BOND tengan que optimizarse en función del tipo de tejido y las condiciones de procesamiento y fijación.

Información adicional

Se puede encontrar información adicional sobre la hibridación *in situ* con los reactivos BOND en la documentación del usuario del sistema BOND.

Advertencias y precauciones

- Este producto está diseñado exclusivamente para su uso diagnóstico *in vitro*.
- Exclusivamente para uso en laboratorio y por profesional cualificado
- Las sondas Kreatech FISH probes están diseñadas para su uso en sistemas BOND.
- No use los reactivos una vez transcurrida la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.
- Lleve prendas, guantes, gafas y protección para la cara adecuados.
- Las sondas Kreatech FISH probes contienen formamida y, por

lo tanto, se deben registrar en el software BOND como residuos peligrosos.

- La formamida puede tener efectos adversos en la reproducción humana. Evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel no protegida. Si se produce contacto con la piel, lávese con agua abundante durante al menos 15 minutos.

PELIGRO

FORMAMIDE

Indicación de peligro

H360D Puede dañar al feto.

Precauciones

P201 Pedir instrucciones especiales para su uso

P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P308+P313 en caso de exposición manifiesta o presunta: consultar con un médico.

P405 Guardar bajo llave.

P501 Desechar el contenido/recipiente en un vertedero autorizado de productos químicos o en el caso de contenido orgánico mediante incineración a alta temperatura.

- Consulte información más detallada en la hoja de datos de seguridad. Para obtener una copia de la hoja de datos de seguridad, póngase en contacto con su distribuidor local o la oficina regional de Leica Biosystems. Las hojas de datos de seguridad están disponibles en el sitio web de Leica Biosystems: www.LeicaBiosystems.com.
- Las muestras, antes y después de la fijación, y todos los materiales expuestos a estas, así como el volumen de sonda sobrante, se deben manipular como si fueran capaces de transmitir infecciones y desechar de acuerdo con las precauciones adecuadas.
- No pipetee nunca con la boca los reactivos y evite que los reactivos o las muestras entren en contacto con la piel y las membranas mucosas.
- Si los reactivos o las muestras entran en contacto con áreas sensibles, lávese con agua abundante. Consulte con un médico.
- Limpie inmediatamente las salpicaduras usando materiales desechables adecuados.
- Todos los materiales se deben eliminar de acuerdo a las normas locales.
- Los pasos de recuperación o los tiempos o las temperaturas de incubación diferentes a los indicados pueden dar resultados erróneos. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo.

Bibliografía

1. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
2. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory

Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.

3. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *in situ* Hybridization. A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.1 - 13.
4. FISH on BOND User Guide (Guía del usuario para FISH en el sistema BOND).

Kreatech™ FISH probes
DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND
N.º do catálogo: KBI-XL015

Utilização prevista
Para uso em diagnóstico *in vitro*
DDIT3 (12q13) Break - XL para BOND destina-se ao uso em sarcoma fixado em formalina, secções de tecidos incluídos em parafina (FFPE). As sondas foram concebidas para serem usadas em conjunção com o BOND FISH kit (DS9636) num sistema automatizado BOND (que inclui os sistemas BOND-MAX e BOND-III). O DDIT3 (12q13) Break - XL para sonda BOND FISH detecta translocações genômicas que envolvem o gene DDIT3 em tecidos FFPE. A sonda foi validada em tecidos de sarcomas.
A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos e controlos adequados e deve ser avaliada dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico por um patologista qualificado.

Resumo e explicação
As Kreatech FISH probes são utilizadas para realizar o procedimento de coloração com hibridização fluorescente *in situ* (FISH) em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina. Após o pré-tratamento adequado, a hibridização das Kreatech FISH probes e uma lavagem rigorosa pós-hibridização com o BOND FISH kit,

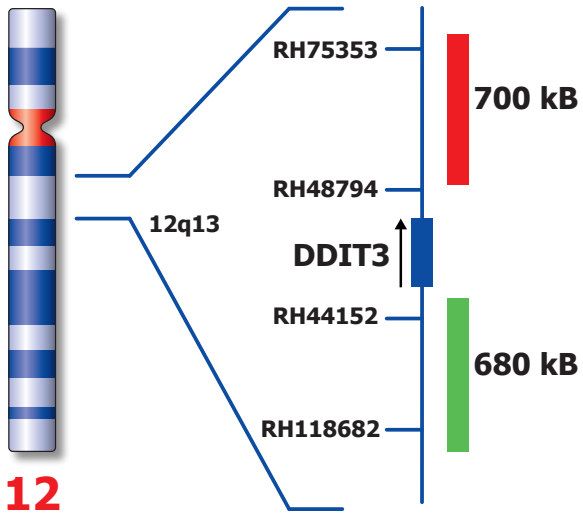
as secções de tecidos devem ser manualmente desidratadas e montadas com DAPI. Os resultados são interpretados mediante microscopia de fluorescência utilizando os filtros recomendados com os comprimentos de onda corretos.

Reagentes fornecidos

Produto Descrição	Nº produto	Volume	Composição
DDIT3 (12q13) Proximal – XL	pKBI-XL015R	1 ml, 10x concentrado	Sondas de ADN Platinum*Bright*™ 550 etiquetadas com fluoróforo em tampão de hibridização. O tampão de hibridização contém < 50% de formamida
DDIT3 (12q13) Distal – XL	pKBI-XL015G	1 ml, 10x concentrado	Sondas de AND Platinum*Bright*™ 495 etiquetado com fluoróforo em tampão de hibridização. O tampão de hibridização contém < 50% de formamidaå

DDIT3 (12q13) Proximal - XL é otimizado para detectar regiões genômicas próximas a pontos de ruptura na região do gene DDIT3.
DDIT3 (12q13) Distal - XL é otimizado para detectar regiões distais próximas a pontos de ruptura na região do gene DDIT3.
A combinação das sondas é usada para detectar translocações de amplificações que envolvem o gene DDIT3 em 12q13.

Tabela 1: Mapas genéticos indicando o tamanho das sondas em par de quilobase (kB), banda de cromossoma e posição genómica definida pelos marcadores STS[1]. A seta adjacente ao gene indica a direção da transcrição do gene. Em DDIT3 (12q13) Distal - XL verde. Em DDIT3 (12q13) Proximal - XL vermelho. Consulte o website da Leica para mais informações sobre os mapas genéticos.



1 Os mapas e as localizações são baseadas num navegador de genoma UCSC, versão GRCh37/hg19, Fev. 2009.

Materiais necessários mas não fornecidos

Consulte “Como usar os reagentes BOND” na documentação de utilizador BOND para consultar a lista completa de materiais necessários para o tratamento da amostra e a hibridização *in situ* com o sistema BOND (que inclui os sistemas BOND-MAX e BOND-III). Além dos reagentes genéricos BOND, os seguintes reagentes são especificamente necessários para a análise de material de doente adequado utilizando as Kreatech FISH probes no sistema BOND (que inclui os sistemas BOND-MAX e BOND-III).

- BOND FISH kit (DS9636)

As Kreatech FISH probes são executadas num sistema BOND (inclui os sistemas BOND-MAX e BOND-III) em conjunto com o BOND FISH kit (DS9636). O BOND FISH kit em conjunto com o *FISH Protocol D pré-instalado no sistema BOND com BDZ v62 ou superior permite que o FISH seja executado no sistema BOND. Este protocolo foi concebido como um protocolo de lavagem pós-hibridização para reduzir a hibridização não especificada de sondas de ácido nucleico. O BOND FISH kit contém o tampão de lavagem pós-hibridização e um único kit é suficiente para 60 testes.

- BOND Hybridization Solution (AR9037)

As sondas devem ser diluídas na concentração preferida utilizando a BOND Hybridization solution.

- BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551)

Para resultados ideais FISH é necessária a digestão de enzimas em combinação com pré-tratamento por calor.

- DAPI (p. e., LK-095A ou LK-096A)

O meio de contraste DAPI não é realizado automaticamente como parte do protocolo FISH no BOND e deve ser feito manualmente utilizando a concentração preferida do meio de contraste DAPI.

Amostras

As Kreatech FISH probes foram testadas em tecidos FFPE que foram cortados a ~5 µm. Os blocos de parafina e as lâminas devem ser armazenados de acordo com as condições de armazenamento e tratamento recomendadas para os resultados ideais, consulte o website Leica.

A cozedura pode ser feita no BOND através do protocolo *Bake and Dewax ou separadamente num forno ou numa incubadora. A temperatura recomendada para a cozedura, bem como a duração é de até 16 horas a 56 °C ou 60 - 120 min a 80 °C.

Instruções de utilização: Diluição e mistura

As Kreatech FISH probes são fornecidas num formato 10x concentrado e devem ser combinadas e diluídas em 1x a concentração final com a BOND Hybridization Solution (AR9037).

Reagente	Volume usado (recomendado)
Sonda 1 (10x) - Vermelho	1,0 ml
Sonda 2 (10x) - Vermelho	1,0 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml
Volume total (1x a concentração final)	10 ml
# Testes	Até 40 testes

Após a diluição da sonda, a mistura deve ser transferida para um recipiente BOND apropriado (recipiente de titulação, recipiente aberto de 7 ml ou de 30 ml de acordo com os volumes preparados) e registada como “sonda de ADN” no BOND.

Ao preparar as diluições para a titulação, certifique-se de que se tem em conta o volume morto do BOND Open Container apropriado (para mais informações sobre os valores consultar a documentação de utilizador BOND). O número exato de testes de um frasco depende do volume morto do recipiente usado e da calibragem do sistema BOND. Consultar a secção de Resolução de problemas para a utilização de concentrações finais que não a 1x.

Consultar “Gestão de reagentes” da sua documentação de utilizador BOND para mais informações sobre o registo de novos reagentes no sistema BOND (que inclui os sistemas BOND-MAX e BOND-III).

Instruções de utilização: pré-tratamento e protocolos

As Kreatech FISH probes foram validadas com o BOND FISH kit, reagentes adjuvantes BOND e o pré-tratamento padrão BOND e protocolos de coloração ilustrados na Tabela 2. O protocolo final pode variar de acordo com o tecido usado pelo utilizador. Todos os desvios dos protocolos prescritos devem ser validados pelo utilizador.

Tabela 2: Protocolos para executar as Kreatech FISH probes

Secção protocolo BOND	Nome protocolo	Tipo protocolo
Staining – ISH Detection	*FISH Protocol D	Pós-hibridização Lavagem
Prestaining – Preparation	*Dewax	Remoção de parafina
Prestaining – Heat Pretreatment	HIER 25 min com ER2 (100) (1)	Pré-tratamento por calor, recuperação de epítopo
Prestaining – Enzyme Pretreatment	*Enzyme 5 for 35 min (2)	Digestão enzimática
Prestaining – ISH denaturation	*D10	Desnaturação 10 min.
Prestaining – ISH detection	*ISH Hybridization (12Hr)	Hybridização 12 hr.

(1) Não é um protocolo predefinido. Para criar um novo protocolo, consulte "Protocolos" na sua documentação de utilizador BOND.

(2) Enzyme 5 deriva do Enzyme Concentrate 1 disponível no BOND Enzyme Pretreatment Kit (AR9551). Consultar a secção Resolução de problemas abaixo para mais detalhes.

Padrões de sinal

DDIT3 (12q13) Break - XL para BOND pode ser usado para detectar translocações que envolvem o gene DDIT3 nos tecidos FFPE. A sonda foi validada nos tecidos de sarcoma usando os protocolos mostrados na tabela 2.

DDIT3 (12q13) Break - XL para BOND foi desenvolvido como um ensaio de duas cores para detectar translocações da região do gene DDIT3 em 12q13. O padrão de sinal normal mostra dois sinais de fusão vermelho/verde (2F), enquanto uma translocação que envolve o gene DDIT3 resulta em um sinal de fusão para o cromossomo 12 normal e um sinal vermelho e um verde para a translocação (1F1R1G). Recomendam-se testes de seguimento se se observarem outros padrões atípicos.

	Padrão de sinais normal	Translocação envolvendo o gene DDIT3 a 12q13
Padrão esperado	2F	1F1R1G

Consulte as diretrizes locais ou gerais para interpretação de padrões de sinal diferentes dos mostrados na tabela.

Exclusão de responsabilidade: O desempenho da DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND foi estabelecido utilizando os procedimentos descritos neste folheto informativo. As modificações a estes procedimentos podem alterar o desempenho do teste. Todos os

desvios dos protocolos indicados devem ser validados pelo utilizador.

Armazenamento e estabilidade

Proteger as sondas da luz direta e forte.
Armazenar a 2 - 8 °C. O produto não aberto é estável sob estas condições até à data de validade indicada no rótulo do frasco. Reponha o reagente não diluído à temperatura 2 - 8 °C imediatamente após a utilização. O reagente da sonda diluído/misturado armazenado num recipiente BOND deve ser reposto à temperatura 2 - 8 °C após a execução. Após a diluição da sonda, as misturas da sonda mantém-se estáveis durante, pelo menos, 30 dias. Após este período, a mistura diluída pode originar resultados abaixo dos ideais.
Não existem sinais óbvios que indiquem a contaminação e/ou instabilidade da sonda. As condições de armazenamento diferentes das especificadas acima têm de ser verificadas pelo utilizador.

Resolução de problemas

Pré-tratamento (sobredigestão): As instruções de utilização do BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551) recomendam uma diluição de 1 gota de Enzyme Concentrate 1 em 7 ml de Diluent a registar como *Enzyme 1 no software BOND.
Esta *Enzyme 1 pode ser demasiado forte para certas amostras quando utilizada em combinação com a Recuperação de epítopo induzida por calor (HIER) e resulta em tecido sobredigerido. Recomenda-se a diluição secundária da *Enzyme 1 (até uma diluição

de 1:300) e um registo separado do reagente no sistema BOND como *Enzyme 5 de modo a evitar a confusão. Em alternativa, pode usar-se a diluição direta de até 1:3000 de Enzyme concentrate 1 em vez da diluição serial da *Enzyme 1.

Diluição da sonda e intensidade do sinal: Recomenda-se a utilização de uma concentração de sonda final a 1x, mas o equilíbrio ideal da sonda depende de fatores como a idade do tecido, a fixação do tecido, o protocolo do pré-tratamento e a preferência pessoal. As concentrações ideais e as relações da sonda podem variar e devem ser determinadas empiricamente pelo utilizador final.

Reagente	Volume usado (recomendado)	Exemplo: Reduzir força do sinal verde	
Sonda 1 (10x) - Vermelho	1,0 ml	Vermelho a 1x:	1,0 ml
Sonda 2 (10x) - Vermelho	1,0 ml	Verde a 0,5x:	0,5 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml		8,5 ml
Volume total a 1x concentração final	10 ml		10 ml
Número de testes	até 40 testes		até 40 testes

Contacte o distribuidor local ou o apoio ao cliente da sede regional da Leica Biosystems para comunicar a coloração invulgar.

Limitações específicas de produto

Os utilizadores que se desviem dos procedimentos de teste recomendados terão de aceitar a responsabilidade da interpretação dos resultados dos doentes nestas circunstâncias. As durações de protocolo podem variar devido à variação do tipo de tecido, fixação e processamento. Além disso, o tempo de incubação e concentração da Enzima BOND pode requerer a otimização de acordo com o tipo de tecido, processamento e condições de fixação.

Outras informações

Para mais informações sobre a hibridização *in situ* com reagentes BOND consulte a sua documentação de utilizador BOND.

Avisos e Precauções

- Este produto destina-se ao diagnóstico *in vitro* apenas
- Apenas para utilização profissional / laboratorial
- As Kreatech FISH probes destinam-se à utilização em sistemas BOND. Não utilizar reagentes depois de terminar o prazo de validade indicado no rótulo
- Usar vestuário de proteção, luvas e proteção ocular/facial adequado
- As Kreatech FISH probes contêm formamida e devem, por isso, ser registadas no software BOND como resíduo perigoso
- A formamida pode ter efeitos adversos na reprodução humana. Evitar a inalação, ingestão ou contacto com a pele não protegida. Se ocorrer contacto com a pele, lave com água abundante durante, pelo menos, 15 minutos

PERIGO

FORMAMIDE

Advertência de perigo

H360D Pode afectar o nascituro.

Recomendações de prudência

P201 Pedir instruções específicas para a utilização.

P280 Usar luvas de proteção / vestuário de proteção / proteção dos olhos / proteção do rosto.

P308+P313 Em caso de exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

P405 Armazenar em local seguro.

P501 Eliminar o conteúdo/recipiente num aterro autorizado para produtos químicos ou, no caso de produtos orgânicos, por incineração a alta temperatura.

- Consultar a Ficha de Dados de Segurança para ter acesso às informações completas. Para obter uma cópia da Ficha de Dados de Segurança contacte o seu distribuidor local ou sede regional da Leica Biosystems. As Fichas de Dados de Segurança estão disponíveis no website da Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com
- As amostras, antes e depois da fixação e todos os materiais a elas expostos, bem como o volume da sonda remanescente, devem ser tratados como sendo transmissíveis de infeção e eliminados com as devidas precauções
- Nunca pipete reagentes com a boca e evite o contacto da pele e as membranas mucosas com reagentes ou amostras
- Se os reagentes ou as amostras entrarem em contacto com zonas delicadas, lave com água abundante. Procurar cuidados médicos
- Limpe os derrames imediatamente utilizando materiais adequados de eliminação

- Todos os materiais têm de ser eliminados de acordo com a legislação local.
- Os passos de recuperação, os tempos de incubação e as temperaturas que não os especificados podem dar origem a resultados erróneos. O utilizador deverá validar todas essas alterações.

Bibliografia

1. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
2. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
3. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *in situ* Hybridization. A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.1 - 13.
4. FISH on BOND User Guide (Guia do utilizador FISH no BOND)

Kreatech™ FISH probes
DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND
Catalogusnummer: KBI-XL015

Beoogd gebruik

Voor *in-vitro* diagnostiek

DDIT3 (12q13) Break - XL voor BOND is ontwikkeld voor gebruik op formaline-gefixeerd, paraffine ingebedde (FFPE) weefsel coupes afkomstig van sarcomen. De probes dienen gebruikt te worden in combinatie met de BOND FISH Kit (DS9636) op een geautomatiseerd BOND systeem (omvat BOND-MAX systeem en BOND-III systeem).

De DDIT3 (12q13) Break - XL voor BOND FISH probe detecteert genomische translocaties waarbij het DDIT3 gen betrokken is in FFPE weefsels. De probe is gevalideerd op sarcoom weefsels.

De klinische interpretatie van iedere kleuring of de afwezigheid daarvan dient aangevuld te worden met morfologische studies en goede controles, en moet worden beoordeeld binnen de context van de klinische voorgeschiedenis van de patiënt en aanvullende diagnostische testen door een gekwalificeerd patholoog.

Samenvatting en Verklaring

Kreatech FISH probes worden gebruikt om een fluorescente *in situ* hybridisatie (FISH) kleuringsprocedure op formaline-gefixeerd, paraffine-ingebed weefsel uit te voeren. Volgend op voorbehandeling, hybridisatie van Kreatech FISH probes en post-hybridisatie stringent wassen met gebruik van de BOND FISH kit, moeten weefsel coupes manueel gedehydreerd worden en afgedekt worden met DAPI. Resultaten worden geïnterpreteerd m.b.v. fluorescentie microscopie met gebruik van aanbevolen filters met de juiste golflengte.

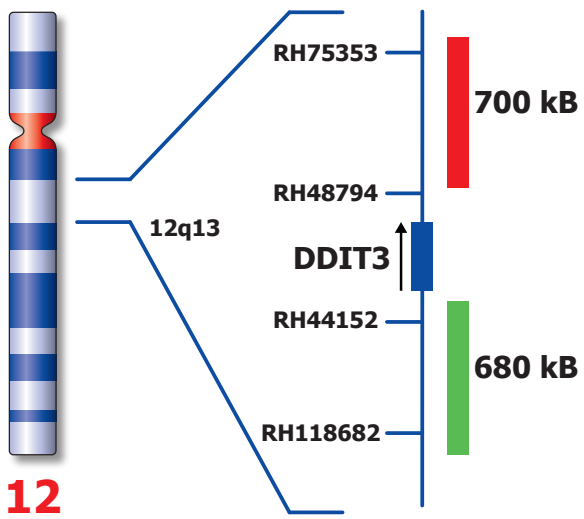
Meegeleverde reagentia

Product omschrijving	Product No.	Volume	Samenstelling
DDIT3 (12q13) Proximal – XL	pKBI-XL015R	1 ml, 10 x concentraat	Platinum*Bright*™ 550 fluorofoor-gelabelde DNA probes in hybridisatie buffer. Hybridisatie buffer bevat < 50% Formamide
DDIT3 (12q13) Distal – XL	pKBI-XL015G	1 ml, 10 x concentraat	Platinum*Bright*™ 495 fluorofoor-gelabelde DNA probes in hybridization buffer. Hybridisatie buffer bevat < 50% Formamide

DDIT3 (12q13) Proximal - XL is geoptimaliseerd voor de detectie van genomische regio's proximaal t.o.v. breekpunten in de DDIT3 gen regio.

DDIT3 (12q13) Distal - XL is geoptimaliseerd voor de detectie van genomische regio's distaal t.o.v. breekpunten in de DDIT3 gen regio. Beide probes worden gecombineerd gebruikt voor de detectie van translocaties waarbij het DDIT3 gen op 12q13 is betrokken.

Tabel 1: De Chromosoomkaart toont de afmeting van de probes in kilobaseparen (kB), de chromosoomband, en de genomische positie aangeduid d.m.v. STS markers[1]. De pijl naast het gen geeft de transcriptie richting van het gen aan. In groen DDIT3 (12q13) Distal - XL. In rood DDIT3 (12q13) Proximal - XL. Bezoek de Leica website voor meer informatie betreffende chromosoomkaarten.



1) Kaarten en locaties zijn gebaseerd op UCSC genome browser, build GRCh37/hg19, Feb.2009.

Vereiste materialen, niet meegeleverd

Raadpleeg “Using BOND Reagents” in uw “BOND user documentation” voor een compleet overzicht van benodigde materialen voor weefselbehandeling en *in situ* hybridisatie m.b.v het BOND systeem (omvat BOND-MAX systeem en BOND-III systeem).

Behalve generieke BOND reagentia, zijn de volgende specifieke reagentia benodigd voor de analyse van geschikt patiëntenmateriaal m.b.v. Kreatech FISH probes op het BOND systeem (omvat BOND-MAX systeem en BOND-III systeem).

- BOND FISH kit (DS9636)

Kreatech FISH probes worden gebruikt op het BOND systeem (omvat BOND-MAX systeem en BOND-III systeem) in combinatie met de BOND FISH kit (DS9636). De BOND FISH kit gecombineerd met *FISH Protocol D, geïnstalleerd op BOND systemen met BDZ v62 of hoger, is noodzakelijk om FISH uit te voeren met het BOND systeem. Dit protocol is ontwikkeld als een post-hybridisatie wasprotocol, om niet-specifieke hybridisatie van DNA probes te reduceren. De BOND FISH kit bevat de post-hybridisatie wasbuffer. Een enkele kit volstaat voor 60 testen

- BOND Hybridization solution (AR9037)

Voor verdunning van de probes tot de gewenste eindconcentratie gebruikt men BOND Hybridization solution.

- BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551)

Enzymatische digestie in combinatie met hitte voorbehandeling is noodzakelijk voor een optimaal FISH resultaat.

- DAPI (bijv. LK-095A of LK-096A)

Tegenkleuring met DAPI is geen onderdeel van het FISH protocol op BOND en moet handmatig worden uitgevoerd met de gewenste concentratie DAPI counterstain / antifade.

Testmonsters

Kreatech FISH probes zijn getest op FFPE weefsel coupes van ~5 µm. Weefsel blokken en coupes moeten worden bewaard volgens de aanbevolen opslag en gebruikscondities voor optimale resultaten, raadpleeg de Leica website.

Bakken kan op de BOND m.b.v het *Bake and Dewax protocol of separaat in een oven of stoof. Het wordt aanbevolen om separaat te bakken gedurende 16 uur bij 56 °C, of 60 - 120 min bij 80 °C.

Gebruiksinstructies: Verdunnen en Mixen

Kreatech FISH probes zijn 10x geconcentreerd en moeten gecombineerd worden en tot een 1x eind concentratie verdund worden met de BOND Hybridization Solution (AR9037).

Reagens	Benodigd volume (aanbevolen)
Probe 1 (10x) - Rood	1,0 ml
Probe 2 (10x) - Groen	1,0 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml
Totaal volume bij (1x)	10 ml
# Testen	Tot 40 testen

Na het verdunnen van de probe, moet de mix overgebracht worden in een geschikte BOND container (titratie container, 7 ml open container of 30 ml open container, afhankelijk van het bereide volume) en geregistreerd als “DNA probe” in de BOND.

Houdt bij het maken van verdunningen rekening met het dode volume van de gebruikte BOND Open Container (raadpleeg uw BOND user documentatie). Het dode volume van de gebruikte container en de kalibratie van het BOND systeem bepalen samen het aantal tests uit 1 vial.

Voor eind concentraties anders dan de aangeraden 1x, raadpleeg de sectie Problemen Oplossen.

Raadpleeg “Reagent Management” in uw BOND gebruikers documentatie voor informatie betreffende het registreren van nieuwe reagentia in het BOND system (omvat BOND-MAX systeem en BOND-III systeem).

Gebruiksinstrukties: Voorbehandeling en Protocollen

Kreatech FISH probes zijn gevalideerd met gebruik van de BOND FISH kit, BOND standaard reagentia en de BOND voorbehandelings- en kleurings protocollen in Tabel 2. Het eind protocol kan variëren afhankelijk van het gebruikte weefsel. Alle afwijkingen van de voorgeschreven protocollen moeten worden gevalideerd door de gebruiker.

Tabel 2: Standaardprotocollen voor het uitvoeren van de Kreatech FISH probes

BOND Protocol Sectie	Protocol Naam	Protocol Type
Staining – ISH Detection	*FISH-protocol D	Post Hybridisatie Was
Prestaining – Preparation	*Dewax	Verwijderen van paraffine
Prestaining - Heat Pretreatment	HIER 25 min with ER2 (100) (1)	Hitte voorbehandeling
Prestaining – Enzyme Pretreatment	Enzyme 5 for 35 min (2)	Enzymatische digestie
Prestaining – ISH denaturation	*D10	Denaturatie 10 min.
Prestaining – ISH detection	*ISH Hybridization (12Hr)	Hybridisatie 12 hr.

(1) Geen standaard protocol. Voor het creëren van een nieuw protocol raadpleeg “Protocollen” in uw BOND user documentatie.

(2) Enzyme 5 is afgeleid van Enzyme Concentrate 1 beschikbaar in de BOND Enzyme Pretreatment Kit (AR9551). Raadpleeg onderstaande Problemen oplossen sectie voor details.

Signaal patronen

DDIT3 (12q13) Break - XL voor BOND kan gebruikt worden om translocaties van het DDIT3 gen in FFPE weefsels te detecteren. De probe is gevalideerd op sarcoom weefsels met gebruik van de protocollen in tabel 2.

DDIT3 (12q13) Break - XL voor BOND is ontworpen als twee-kleuren

test om translocaties waarbij de DDIT3 gen regio op 12q13 is betrokken te detecteren. Het normale signaal patroon toont twee rood/groene fusie signalen (2F), terwijl een translocatie van het DDIT3 gen resulteert in een fusie signaal voor het normale chromosoom 2 en separate rode en groene signalen voor de translocatie (1F1R1G). Als andere, atypische patronen worden waargenomen, wordt het geadviseerd om vervolg testen uit te voeren.

	Normaal Signaal Patroon	Translocatie van het DDIT3 gen op 12q13
Verwacht Patroon	2F	1F1R1G

Raadpleeg de lokale of algemene richtlijnen voor interpretatie van signaalpatronen die niet in de tabel zijn weergegeven.

Disclaimer: De werking van DDIT3 (12q13) Break – XL voor BOND is vastgesteld met gebruik van de procedures zoals beschreven in deze handleiding. Aanpassingen aan deze procedures hebben mogelijk een effect op de resultaten van de test. Iedere aanpassing van de omschreven protocollen moet gevalideerd worden door de gebruiker.

Opslag en Stabiliteit

Bescherm de probes tegen sterk en direct licht.

Bewaar bij 2 - 8 °C. Het ongeopende product is stabiel onder deze condities tot de verloopdatum zoals aangegeven op het etiket op de ampul.

De onverdunde probe dient direct na gebruik gekoeld opgeslagen te worden bij 2 - 8 °C. Verdunde/gemixte probe reagens bewaard in een BOND container dient direct na de BOND run opgeslagen te worden bij 2 - 8 °C.
Na verdunning blijven probe mixen tot 30 dagen stabiel. Na deze periode kan gebruik van de verdunde mix tot suboptimale resultaten leiden.
Er zijn geen indicaties die wijzen op contaminatie en/of instabiliteit van de probe. Opslag van de probe onder ander condities dan hier gespecificeerd moet door de gebruiker gevalideerd worden.

Problemen oplossen

Voorbehandelling (overdigestie): De gebruiks-instructies van de BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551) bevelen een verdunning van 1 druppel Enzyme Concentrate 1 in 7 ml Diluent aan, te registreren als *Enzyme1 in de BOND software.
*Enzyme 1 kan voor bepaalde weefsels te sterk zijn bij gebruik in combinatie met de Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) en resulteren in over-gedigesteerd weefsel. Een tweede verdunningstap van *Enzyme 1 (naar max. 1:300 verdunning) en een aparte registratie van het verdunde reagens op het BOND systeem als *Enzyme 5 wordt aanbevolen om verwarring te voorkomen. Als alternatief kan een directe verdunning naar 1:3000 van Enzyme concentrate 1 gemaakt worden i.p.v. de doorverdunning van *Enzyme 1.
Probe verdunning en Signaal intensiteit: Een 1x eindconcentratie

probe wordt aanbevolen voor gebruik, maar een optimale probe balans is mede afhankelijk van factoren zoals weefselleeftijd, weefselfixatie, voorbehandelingsprotocol en persoonlijke voorkeur. Optimale concentraties en probe ratio's kunnen variëren en moeten worden vastgesteld door de eindgebruiker.

Reagens	Gebruikt volume (aanbevolen)	Voorbeeld: Verlaging van de groene signaalsterkte	
Probe 1 (10x) – Rood	1,0 ml	Rood op 1x : Eindconcen-tratie	1,0 ml
Probe 2 (10x) – Groen	1,0 ml	Groen op 0,5x: Eindconcen-tratie	0,5 ml
BOND hybridization-solution (AR9037)	8,0 ml		8,5 ml
Totaal volume bij 1x eindcon-centratie	10 ml		10 ml
Aantal tests	tot 40 testen		tot 40 testen

Neem contact op met uw lokale distributeur of de klanten service van uw regionale kantoor van Leica Biosystems om ongewone kleuring te melden.

Product Specifieke Beperkingen

Gebruikers die afwijken van aanbevolen procedures moeten de verantwoordelijkheid accepteren voor de interpretatie van patiëntresultaten onder deze omstandigheden. Protocoltijden kunnen variëren t.g.v. variatie in weefseltype, fixatie en doorvoerprotocol. Mogelijk moeten BOND Enzyme concentratie en incubatietijd geoptimaliseerd worden afhankelijk van weefseltype, fixatie en doorvoerprotocol.

Overige Informatie

Overige informatie over *in situ* hybridizatie met BOND reagentia kan gevonden worden in uw BOND gebruikers documentatie.

Waarschuwingen en Voorzorgsmaatregelen

- Dit product is uitsluitend bedoeld voor gebruik in *in vitro* diagnostiek
- Alleen voor laboratorium / professioneel gebruik
- Kreatech FISH probes zijn bedoeld voor gebruik op BOND systemen.
- Gebruik reagentia niet na de verloopdatum aangegeven op de verpakking
- Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen en oog/gelaatsbescherming
- Kreatech FISH probes bevatten formamide en moeten daarom als gevaarlijk afval geregistreerd worden in de BOND software

- Formamide kan negatieve effecten op de ontwikkeling van het ongeboren kind hebben. Voorkom inhalatie, inname of contact met de onbeschermde huid. In geval van huidcontact, overvloedig wassen met veel water gedurende ten minste 15 minuten.

GEVAAR

FORMAMIDE

Gevaarsverklaring

H360D Kan de vruchtbaarheid of het ongeboren kind schaden.

Voorzorgsmaatregelen

P201 Alvorens te gebruiken, de speciale aanwijzingen raadplegen.

P280 Beschermende handschoenen/beschermende kleding/ oogbescherming/gelaatsbescherming dragen.

P308+P313 Na (mogelijke) blootstelling: een arts raadplegen.

P405 Achter slot bewaren.

P501 Inhoud/verpakking afvoeren naar bevoegde chemische stortplaats of indien organisch naar hoge temperatuur verbrandingsinstallatie.

- Raadpleeg de veiligheidsbladen (SDS) voor volledige details. Neem contact op met uw lokale distributeur of regionale kantoor

van Leica Biosystems om een kopie van de SDS te ontvangen. SDS zijn ook beschikbaar op de Leica Biosystems webpagina, www.LeicaBiosystems.com

- Monsters, voor en na fixatie en alle daaraan blootgestelde materialen en restanten van de probe moeten als infectieus beschouwd worden en met de van toepassing zijnde voorzorgsmaatregellen afgevoerd worden.
- Pipetteer nooit reagentia met de mond en voorkom contact met de huid of slijmvliezen van reagentia of monsters.
- In geval van contact van reagens of monsters met gevoelige zones; wassen met overvloedige hoeveelheden water en medisch advies inwinnen.
- Maak verontreinigde werkplekken onmiddellijk schoon met geschikte wegwerp materialen.
- Afval afvoeren volgens de lokale wet- en regelgeving.
- Retrieval stappen, incubatie tijden of temperaturen, anders dan gespecificeerd, kunnen foutieve resultaten tot gevolg hebben. Elke verandering in deze processen moet door de gebruiker gevalideerd worden.

Bibliografie

1. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
2. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from

infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
3. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *in situ* Hybridization. A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.1 - 13.
4. FISH on BOND User Guide

Kreatech™ FISH probes
DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND
Katalognr: KBI-XL015

Avsedd användning
För diagnostisk användning *in vitro*
DDIT3 (12q13) Break - XL för BOND är avsedd att användas för formalinfixerade, parafininbäddade (FFPE) vävnadssnitt av sarkom. Proberna ska användas i kombination med BOND FISH Kit (DS9636) på ett automatiserat BOND-system (inkluderar BOND-MAX-system och BOND-III-system).
DDIT3 (12q13) Break - XL för BOND FISH-proben registrerar gentranslokationer av DDIT3-genen i FFPE-vävnad. Proben har validerats på sarkomvävnader.
Klinisk tolkning av färgningar eller bristen på färgningar ska kompletteras med morfologiska studier och ordentliga kontroller ochska utvärderas inom ramen för patientens kliniska historik och andra diagnostiska tester av en kvalificeradpatolog.

Sammanfattning och förklaring
Kreatech FISH probes används för att utföra en fluorescerande *in situ*-hybridisering (FISH) färgningsprocedur på formalinfixerade, paraffininbäddade vävnader. Efter lämplig förbehandling, hybridisering av Kreatech FISH probes och efterföljande stringenstvätt med BOND FISH kit ska vävnadssnitten dehydreras manuellt och monteras med

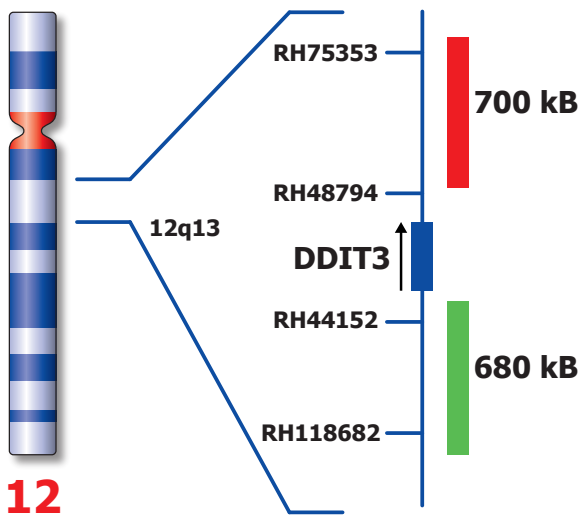
DAPI. Resultaten tolkas med fluorescensmikroskopi med hjälp av de rekommenderade filtren med lämpliga våglängder.

Medföljande reagenser

Produkt-beskrivning	Produktnr.	Mängd	Sammansättning
DDIT3 (12q13) Proximal – XL	pKBI-XL015R	1 ml, 10x koncentrat	Platinum*Bright*™550 fluorofor-märkta DNA-prober i hybridiseringsbuffert. Hybridiseringsbuffert innehåller < 50 % formamid
DDIT3 (12q13) Distal – XL	pKBI-XL015G	1 ml, 10x koncentrat	PlatinumBright™495 fluorofor-märkta DNA-prober i hybridiseringsbuffert. Hybridiseringsbuffert innehåller < 50 % formamid

DDIT3 (12q13) Proximal - XL är optimerad för att registrera genregioner proximalt till brytpunkter i DDIT3-genregionen.
DDIT3 (12q13) Distal - XL är optimerad för att registrera genregioner distalt till brytpunkter i DDIT3-genregionen.
Båda proberna i kombination används för att registrera translokationer för DDIT3-genen vid 12q13.

Tabell 1: Kromosomkarta som visar probernas storlek i kilobaspar (kB), kromosomband och position i genomet definierad av STS-markörer[1]. Pilen bredvid genen anger dess transkriptionsriktning. I grönt DDIT3 (12q13) Distal - XL. I rött DDIT3 (12q13) Proximal - XL. Se Leicas hemsida för mer information om kromosomkartor.



1) Kartor och lägen grundar sig på UCSC genome browser, build GRCh37/hg19, Feb.2009.

Nödvändigt material som inte medföljer

Se "Användning av BOND-reagens" i din BOND-användardokumentation för en komplett lista över material som krävs för behandling av prover och hybridisering *in situ* med BOND-systemet (inkluderar BOND-MAX-system och BOND-III-system).

Utöver de generiska BOND-reagens krävs följande specifika reagens för analys av lämpligt patientmaterial med Kreatech FISH probes på BOND-systemet (inkluderar BOND-MAX-system och BOND-III-system).

- BOND FISH kit (DS9636)

Kreatech FISH probes körs på ett BOND-system (inkluderar BOND-MAX-system ochBOND-III-system) i kombination med BOND FISH kit (DS9636). BOND FISH kit i kombination med *FISH Protocol D, förinstallerat på BOND-systemet med BDZ v62 eller högre, krävs för att FISH ska kunna köras på BOND-systemet. Detta protokoll är utformat som ett protokoll för tvätt efter hybridisering, för att reducera icke-specifik hybridisering av DNA-prober. BOND FISH kit innehåller en tvättbuffert att använda efter hybridisering och en sats räcker till 60 tester.

- BOND Hybridization solution (AR9037)

Proberna späds ut till önskad koncentration med BOND Hybridization solution.

- BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551)

Enzymspjälkning i kombination med värmeförbehandling krävs för optimala FISH-resultat.

- DAPI (t.ex. LK-095A eller LK-096A)

DAPI-infärgning genomförs inte automatiskt som en del av FISH-protokollet på BOND och ska utföras manuellt med föredragen koncentration av DAPI counterstain / antifade.

Prover

Kreatech FISH probes har testats på FFPE-vävnader, vilka snittades vid ~5 µm. Vävnadsblock och snittade objektglas ska förvaras enligt rekommenderade förvarings- och hanteringsförhållanden för optimala resultat, se Leicas hemsida.
Bakning kan ske antingen på BOND med hjälp av *Bake and Dewax protocol eller separat i en ugn eller inkubator. Rekommenderad bakningstemperatur och -tid är upp till 16 timmar vid 56 °C eller 60 - 120 minuter vid 80 °C.

Bruksanvisning: Spädning och blandning

Kreatech FISH probes tillhandahålls i ett 10x koncentrerat-format och ska kombineras och spädas till en 1x slutlig koncentration med BOND Hybridization Solution (AR9037).

Reagens	Använd volym (rekommenderad)
Prob 1 (10x) - Röd	1,0 ml
Prob 2 (10x) - Grön	1,0 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml
Total volym (1x slutlig koncentration)	10 ml
Antal	Upp till 40 prover

Efter spädning av proben ska blandningen överföras till en lämplig BOND-behållare (titreringsbehållare, 7 ml öppen behållare eller 30 ml öppen behållare, beroende på framställda volymer) och registreras som “DNA-prob” i BOND.

Vid förberedelse av spädning för titrering ska hänsyn tas till dödvolymen i lämplig BOND Open Container (för värden, se din BOND-användardokumentation). Det exakta antalet tester som kan fås från en flaska beror på dödvolymen i den använda behållaren och kalibreringen av BOND-systemet.

Se avsnittet Felsökning för användningen av slutliga koncentrationer annat än 1x.

Se avsnittet “Reagenshantering” i din BOND-användardokumentation för information om registrering av nya reagens på BOND-systemet (inkluderar BOND-MAX-system och BOND-III-system).

Bruksanvisning: Förbehandling och protokoll

Kreatech FISH probes har validerats med BOND FISH kit, BOND hjälpreagens och de BOND-protokoll för förbehandling och färgning som anges i tabell 2. Det slutliga protokollet kan variera i enlighet med vävnaden som används av användaren. Eventuella avvikelser från de föreskrivna protokollen måste valideras av användaren.

Tabell 2: Protokoll för att köra Kreatech FISH probes

BOND protokollavsnitt	Protokollnamn	Protokolltyp
Staining – ISH Detection	*FISH Protocol D	Tvätt efter hybridisering
Prestaining – Preparation	*Dewax	Borttagning av paraffin
Prestaining – Heat Pretreatment	HIER 25 min with ER2 (100) (1)	Värmeförbehandling , Epitopåtervinning
Prestaining – Enzyme Pretreatment	*Enzyme 5 for 35 min (2)	Enzymatisk spjälkning
Prestaining – ISH denaturation	*D10	Denaturering 10 min.
Prestaining – ISH detection	*ISH Hybridization (12Hr)	Hybridisering 12 tim.

(1) Ej ett fördefinierat protokoll. För att skapa ett nytt protokoll, se “Protokoll” i din BOND-användardokumentation.

(2) Enzym 5 framställs från Enzyme Concentrate 1 som finns i BOND Enzyme Pretreatment Kit (AR9551). Se avsnittet Felsökning nedan för detaljer.

SE

Signalmönster

DDIT3 (12q13) Break - XL för BOND kan användas för att registrera translokationer av DDIT3-genen i FFPE-vävnad. Proben har validerats på sarkomvävnader med de protokoll som visas i tabell 2.

DDIT3 (12q13) Break - XL för BOND är konstruerad som ett dubbelfärgstest för att registrera translokationer av DDIT3-genregionen vid 12q13. Det normala signalmönstret visar två röd/gröna fusionssignaler (2F), medan en translokation av DDIT3-genen resulterar i en fusionssignal för normal kromosom 12 och en röd och en grön signal för translokationen (1F1R1G).

Uppföljande tester rekommenderas om andra, atypiska mönster observeras.

	Normalt signalmönster	Translokation som involverar DDIT3-gen vid 12q13
Förväntat mönster	2F	1F1R1G

Konsultera lokala eller allmänna riktlinjer för tolkning av andra signalmönster än vad som visas i tabellen.

Friskrivning: Prestandan hos DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND har fastställts med de procedurer som beskrivs i denna bipacksedel. Ändringar i dessa procedurer kan ändra analysens prestanda. Eventuella avvikelser från de angivna protokollen måste valideras av användaren.

Förvaring och stabilitet

Skydda proberna från starkt och direkt solljus.
Förvara vid 2 - 8 °C. Oöppnad produkt är stabil under dessa förhållanden fram till utgångsdatumet som anges på flaskans etikett.
Förvara outspädd reagens vid 2 - 8 °C direkt efter användning. Utspädd/blandad probreagens som förvaras i en BOND-behållare bör förvaras vid till 2 - 8 °C efter användning.
Efter utspädning av proben är probblandningar stabila i upp till 30 dagar. Efter denna period kan den utspädda blandningen ge suboptimala resultat.
Det finns inga tydliga tecken som pekar på kontaminering av och/eller instabilitet hos proben. Andra förvaringsförhållanden än de som anges ovan måste verifieras av användaren.

Felsökning

Förbehandling (överspjälkning): Bruksanvisningen för BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551) rekommenderar en utspädning med 1 droppe av Enzyme Concentrate 1 i 7 ml av Diluent för att registreras som *Enzyme 1 i BOND-programvaran.
Detta *Enzyme 1 kan vara för starkt för vissa prover när det används i kombination med Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) och resultera i överspjälkad vävnad. En ytterligare utspädning av *Enzyme 1 (utspädning upp till 1:300) rekommenderas och en separat registrering av reagensen i BOND-systemet som *Enzyme 5 rekommenderas för att förhindra förvirring. Alternativt kan en direkt utspädning på upp

till 1:3000 av Enzyme concentrate 1 användas i stället för den seriella utspädningen av *Enzyme 1.

Sondutspädning och signalintensitet: En 1x slutlig probkoncentration rekommenderas för användning, men optimal probbalans beror på faktorer såsom vävnadsålder, vävnadsfixering, förbehandlingsprotokoll och personlig preferens. Optimala koncentrationer och probförhållanden kan variera och ska fastställas empiriskt av slutanvändaren.

Reagens	Använd volym (rekommenderad)	Exempel: Minska grön signalstyrka	
Sond 1 (10x) – röd	1,0 ml	Röd vid 1x:	1,0 ml
Sond 2 (10x) – grön	1,0 ml	Grön vid 0,5x:	0,5 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml		8,5 ml
Total volym vid 1x slutlig koncentration	10 ml		10 ml
Antal tester	upp till 40 tester		upp till 40 tester

Kontakta din lokala distributör eller kundservice på Leica Biosystems regionkontor för att rapportera eventuell ovanlig färgning.

Produktspecifika begränsningar

Användare som avviker från rekommenderade testprocedurer måste ta ansvar för tolkningen av patientresultat under dessa omständigheter. Protokolltider kan variera efter variationer i vävnadstyp, fixering och bearbetning. Dessutom kan BOND-enzymkoncentrationen och inkubationstiden behöva optimeras beroende på vävnadstyp, bearbetning och fixeringsförhållanden.

Ytterligare information

Mer information om hybridisering *in situ* med BOND-reagens återfinns i din BOND-användardokumentation.

Varningar och försiktighetsåtgärder

- Denna produkt är endast avsedd för diagnostisk användning *in vitro*
- Endast för användning i laboratorium/professionell användning
- Kreatech FISH probes är avsedda för användning på BOND-system.
- Använd inte reagens efter det utgångsdatum som anges på förpackningens etikett
- Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar och ögon/ansiktsskydd
- Kreatech FISH probes innehåller formamid och ska därför registreras i BOND-programvaran som farligt avfall
- Formamid kan ha negativ inverkan på det mänskliga reproduktionssystemet. Undvik inandning, sväljning eller kontakt

med oskyddad hud. Vid hudkontakt ska huden tvättas med stora mängder vatten i minst 15 minuter

FARA

FORMAMID

Riskangivelser

H360D Kan skada foster.

Skyddsangivelser

P201 Inhämta speciell bruksanvisning.

P280 Använd skyddshandskar / skyddskläder / ögonskydd / ansiktsskydd.

P308 + P313 Vid exponering eller oro: Uppsök medicinsk rådgivning/vård.

P405 Förvara inlåst.

P501 Kassera innehåll/behållare hos en auktoriserad insamlingsplats för kemiskt avfall eller till högtemperaturförbränning i händelse av organiskt material.

Bibliografi

1. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
2. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
3. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *in situ* Hybridization. A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.1 - 13.
4. FISH on BOND User Guide (FISH on BOND Bruksanvisning).

Kreatech™ FISH probes
DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND
Katalognr: KBI-XL015

Anvendelse
Til *in vitro*-diagnostisk brug
DDIT3 (12q13) Break - XL til BOND er beregnet til brug på formalinfikserede, paraffinindlejrede (FFPE) vævssektioner fra sarkom. Proberne skal benyttes i kombination med BOND FISH Kit (DS9636) på et automatiseret BOND-system (inkluderer BOND-MAX-system og BOND-III system).
DDIT3 (12q13) Break - XL til BOND FISH proben registrerer gentranslokationer, som omfatter DDIT3 genet, i FFPE væv. Proben er valideret på sarkomvæv.
Den kliniske fortolkning af enhver farvning eller dens fravær skal komplementeres af morfologiske studier og passende kontroller og bør evalueres af en kvalificeret patolog inden for konteksten af patientens kliniske historik og andre diagnostiske tests.

Resumé og forklaring
Kreatech FISH probes bruges til at udføre en farveprocedure med fluorescens *in situ*-hybridisering (FISH) på formalinfikseret, paraffinindstøbt væv. Efter passende forbehandling, hybridisering med Kreatech FISH probes og post-hybridisering stringent vask vha. BOND FISH kit skal vævssnittene dehydreres manuelt og monteres

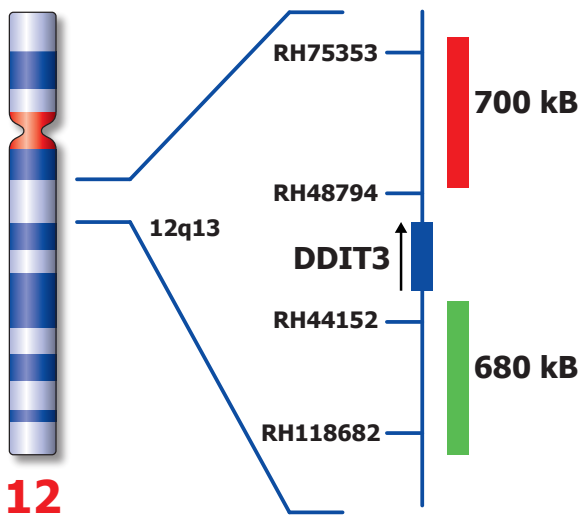
med DAPI. Resultaterne fortolkes med fluorescensmikroskopi ved anvendelse af de anbefalede filtre med passende bølgelængder.

Medfølgende reagenser

Produkt Beskrivelse	Produkt nr.	volumen	sammensætning
DDIT3 (12q13) Proximal – XL	pKBI-XL015R	1 ml, 10 x koncentrat	Platinum*Bright*™550 fluorofor-mærket DNA-probe i hybridiseringsbuffer. Hybridiseringsbuffer indeholder < 50 % formamid
DDIT3 (12q13) Distal – XL	pKBI-XL015G	1 ml, 10 x koncentrat	PlatinumBright™495 fluorofor-mærket DNA -probe i hybridiseringsbuffer. Hybridiseringsbuffer indeholder <50 % formamid

DDIT3 (12q13) Proximal - XL er optimeret til at registrere genområder proksimalt på brudpunkterne i DDIT3 genområdet.
DDIT3 (12q13) Distal - XL er optimeret til at registrere genområder distalt på brudpunkter i DDIT3 genområdet.
Begge prober anvendes i kombination til at registrere translokationer, som omfatter DDIT3 genet, ved 12q13.

Tabel 1: Kromosomkort, der viser størrelsen på proberne i kilobasepar (kB), kromosombånd og genomisk position defineret af STS-markører1. Pilen tæt ved genet indikerer transkriptionsretningen på genet. Grøn DDIT3 (12q13) Distal - XL. Rød DDIT3 (12q13) Proximal - XL. Se Leicas hjemmeside for mere information om kromosomkort.



1) Kort og steder er baseret på UCSC genome browser, build GRCh37/hg19, Feb.2009.

Nødvendige materialer der ikke medfølger

Se "Brug af BOND-reagenser" i din BOND-brugerdokumentation for en komplet oversigt over materialer, som kræves til prøvebehandling og *in situ*-hybridisering vha. BOND-systemet (inkluderer BOND-MAX-systemet og BOND-III-systemet).

Udover de generiske BOND-reagenser er følgende reagenser specielt krævet til analyse af passende patientmateriale vha. Kreatech FISH probes på BOND-systemet (inkluderer BOND-MAX-systemet og BOND-III-systemet).

- BOND FISH kit (DS9636)

Kreatech FISH probes køres på et BOND-system (inkluderer BOND-MAX-system og BOND-III-system) i kombination med BOND FISH kit (DS9636). BOND FISH kit i kombination med *FISH Protocol D forudinstalleret på BOND-systemet med BDZ v62 eller højere er nødvendig, for at FISH kan køres på BOND-systemet. Denne protokol er designet som en post-hybridiseringsvaskeprotokol for at reducere uspecifik hybridisering af nukleinsyre prober. BOND FISH kit indeholder post-hybridiseringsvaskebuffer, og et enkelt sæt er nok til 60 tests.

- BOND Hybridization solution (AR9037)

Proberne skal fortyndes til den foretrukne koncentration vha. BOND Hybridization solution.

- BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551)

Enzymfordøjelse i kombination med varmeforbehandling er nødvendig for optimale FISH-resultater.

- DAPI (f.eks., LK-095A eller LK-096A)

DAPI-kontrastfarvning udføres ikke automatisk som del af FISH Protocollen på BOND og skal udføres manuelt ved brug af den foretrukne koncentration af DAPI counterstain / antifade.

Prøver

Kreatech FISH probes er blevet testet på FFPE-skåret ved ~5 µm. Vævsblokke og anvendte objektglas bør opbevares ifølge de anbefalede opbevarings- og håndteringsforhold for optimale resultater, se Leicas hjemmeside.

Bagning kan udføres enten på BOND'en vha. *Bake and Dewax protocol eller separat i en ovn eller inkubator. Anbefalet bagetemperatur og -tid er op til 16 timer ved 56 °C eller 60 - 120 min ved 80 °C.

Brugsanvisning: Fortynding og blanding

Kreatech FISH probes leveres i et 10 x koncentreret format og skal kombineres og fortyndes til en 1 x slut koncentration vha. af BOND Hybridization solution (AR9037).

Reagens	Brugt volume (anbefalet)
Probe 1 (10 x) - rød	1,0 ml
Probe 2 (10 x) - grøn	1,0 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml
Total volumen (1x endelig koncentration)	10 ml
Antal	Op til 40 tests

Efter fortynding af proberne skal blandingen overføres til en egnet BOND-beholder (titreringsbeholder, 7 ml åben beholder eller 30 ml åben beholder, afhængigt af de forberedte volumener) og registreres som “DNA probe” i BOND.
Ved forberedelse af fortyndinger til titrering skal der sørges for, at der gøres plads til død volumen for den egnede BOND Open Container(for værdier se din BOND-brugerdokumentation). Det nøjagtige antal af tests fra et hætteglas afhænger af den anvendte beholders død volumen og kalibreringen af BOND-systemet.
Se afsnittet Fejlfinding vedr. brug af slut koncentrationer udover 1x.
Se “Reagensbehandling” i din BOND -brugerdokumentation for information om registrering af nye reagenser i BOND-systemet (inkluderer BOND-MAX-systemet og BOND-III -systemet).

Brugsvejledning: Forbehandling og protokoller

Kreatech FISH probes er valideret vha. BOND FISH kit, BOND-hjælpereagenser samt standard BOND-forbehandling og farvningsprotokoller vist i tabel 2. Den endelige protokol kan variere alt efter det væv, som brugeren anvender. Enhver afvigelse fra de foreskrevne protokoller skal valideres af brugeren.

Tabel 2: Protokoller til kørsel af Kreatech FISH probes

BOND-protokolafsnit	Protokolnavn	Protokoltype
Staining – ISH Detection	*FISH Protocol D	Efter hybridisering Vask
Prestaining – Preparation	*Dewax	Fjernelse af paraffin
Prestaining – Heat Pretreatment	HIER 25 min with ER2 (100) (1)	Varme forbehandling, epitopgenfinding
Prestaining – Enzyme Pretreatment	*Enzyme 5 to 35 min (2)	Enzymatisk fordøjelse
Prestaining – ISH denaturation	*D10	Denaturation 10 min.
Prestaining – ISH detection	*ISH Hybridization (12Hr)	Hybridisering 12 t.

(1) Ikke en prædefineret protokol. Se "Protokoller" i din BOND-brugerdokumentation for at skabe en ny protokol.

(2) Enzyme 5 er afledt af Enzyme Concentrate 1 tilgængelig i BOND Enzyme Pretreatment Kit (AR9551). Se afsnittet Fejlfinding herunder for detaljer.

Signalmønstre

DDIT3 (12q13) Break - XL til BOND kan bruges til at registrere translokationer, som omfatter DDIT3 genet, i FFPE væv. Proben er valideret på sarkomvæv ved brug af protokollerne i tabel 2.

DDIT3 (12q13) Break – XL – XL til BOND er designet som en tofarvet analyse til registrering af translokationer af DDIT3] genområdet ved 12q13. Det normale signalmønster viser to røde/grønne

fusionssignaler (2F), mens translokationer, der omfatter DDIT3 genet, giver ét fusionssignal for normalt kromosom 12 og ét rødt og ét grønt signal for translokationen (1F1R1G).
Opfølgningstestning anbefales, hvis andre, atypiske mønstre observeres.

	Normalt Signalmønster	Translokation, der DDIT3-genet ved 12q13
Forventet mønster	2F	1F1R1G

Se de lokale eller generelle retningslinjer for fortolkning af andre signalmønstre end det der vises i tabellen.
Ansvarsfraskrivelse: DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND probens diagnostiske værdi er etableret vha. procedurerne beskrevet på denne indstiksseddel. Modifikationer af disse procedurer kan ændre analysens diagnostiske værdi. Enhver afvigelse fra de foreskrevne protokoller skal valideres af brugeren.

Opbevaring og stabilitet

Beskyt prober mod stærkt og direkte lys.
Opbevares ved 2 - 8 °C. Det uåbnede produkt er stabilt under disse forhold helt op til udløbsdatoen indikeret på hætteglasetiketten.
Returnér det ufortyndede reagens til 2 - 8 °C umiddelbart efter brug. Ufortyndet/blandet reagens opbevaret i en BOND-beholder bør returneres til 2 - 8 °C efter at være blevet kørt.
Efter probefortynding er probeblandinger stabile i mindst 30

dage. Efter denne periode kan den fortyndede blanding resultere i suboptimale resultater. Der er ingen tydelige tegn på forurening og/eller ustabilitet af proben. Andre opbevaringsforhold end dem, der er specificeret herover, skal verificeres af brugeren.

Fejlfinding

Forbehandling (overdigestion): Brugsanvisning til BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551) anbefaler en fortynding med 1 dråbe Enzyme Concentrate 1 i 7 ml Diluent, som skal registreres som *Enzyme 1 i BOND-softwaren.

Dette *Enzyme 1 kan være for stærkt for nogle prøver, når det bruges i kombination med Heat Induced Epitope Retrieval (HIER), og resultere i overfordøjet væv. En sekundær fortynding af *Enzyme 1 (op til 1:300 fortynding) anbefales, og en separat registrering af reagenset på BOND-systemet som *Enzyme 5 anbefales for at undgå forvirring. Alternativt kan en direkte fortynding med op til 1:3000 af Enzyme Concentrate 1 bruges i stedet for den serielle fortynding af *Enzyme 1.

Probefortynding og signalintensitet: En 1x slut probekoncentration anbefales til brug, men optimal probebalance er afhængig af faktorer såsom vævsalder, vævsfiksering, forbehandlingsprotokol og personlig præference. Slutkoncentrationer og probeforholdstal kan variere og skal fastsættes empirisk af slutbrugeren.

Reagens	Brugt volume (anbefalet)	Eksempel: Reducér grøn signalstyrke	
Probe 1 (10x) - rød	1,0 ml	Rød ved 1 x:	1 ml
Probe 2 (10x) - grøn	1,0 ml	Grøn ved 0,5 x:	0,5 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml		8,5 ml
Total volumen ved 1x endelig koncentration	10 ml		10 ml
Antal tests	op til 40 tests		op til 40 tests

Kontakt din lokale distributør eller det regionale Leica Biosystems-kontor for at rapportere enhver usædvanlig farvning.

Produktspecifikke begrænsninger

Brugere, som afviger fra anbefalede testprocedurer, skal acceptere ansvar for fortolkning af patientresultater under disse omstændigheder. Protokoltider kan variere pga. variation i vævstype, fiksering og bearbejdning. Desuden kan BOND-enzymkoncentration og inkubationstid kræve optimering afhængigt af vævstype, bearbejdnings- og fikseringsforhold.

Yderligere information

Yderligere information om *in situ*-hybridisering med BOND-reagenser kan findes i din BOND-brugerdokumentation.

Advarsler og forholdsregler

- Dette produkt er kun beregnet til *in vitro*-diagnostisk brug
- Kun til laboratorie-/professionel brug
- Kreatech FISH probes er beregnet til brug på BOND-systemer.
- Brugikke reagenser efter udløbsdatoen angivet på pakkens etiket
- Bær passende beskyttelsestøj, handsker og øjen-/ansigtsbeskyttelse
- Kreatech FISH probes indeholder formamid og bør derfor registreres i BOND-softwaren som farligt affald
- Formamid kan have en ugunstig effekt på menneskelig reproduktion. Undgå inhalering, indtagelse eller kontakt med ubeskyttet hud. Hvis der opstår kontakt med hud, vaskes med rigelige mængder vand i mindst 15 minutter

FARE

FORMAMID

Risikoerklæring

H360D Kan skade det ufødte barn.

Sikkerhedsudtalelser

P201 Indhent speciel brugsanvisning.

P280 Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsesdragt/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse

P308 + P313 Ved eksponering eller bekymring: Søg lægehjælp/-behandling.

P405 Opbevares aflåst

P501 Indhold/beholdere skal afleveres på autoriseret, kemisk affaldsdeponering eller, hvis organisk, brændes ved høj afbrændingstemperatur.

- Se SDS for alle detaljer. Kontakt din lokale distributør eller regionale Leica Biosystems-kontor for at få en kopi af Safety Data Sheet. Sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets) er tilgængelige på Leica Biosystems hjemmeside, www.LeicaBiosystems.com
- Prøver fra før og efter fixering og resterende probevolumen, samt alle materialer udsat for dem, bør håndteres, som om de er i stand til at overføre infektion, og bør bortskaffes med passende forholdsregler

- Benyt aldrig mundpipettering, og undgå berøring af hud og slimhinder med reagenser eller prøver
- Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, vaskes med rigelige mængder vand. Søg lægehjælp
- Spild opsamles med det samme vha. egnede engangsmaterialer
- Alle materialer skal bortskaffes i overensstemmelse med lokal lovgivning.
- Andre Genfindingstrin, inkubationstider eller temperaturer, end dem, der er specificeret, kan give fejlagtige resultater. Enhver sådan ændring skal valideres af brugeren.

Bibliografi

1. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
2. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Bestillingsnr. M29-P.
3. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. I: Wilkinson DG. (ed.) *in situ* Hybridization. A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, s.1 - 13.
4. FISH on BOND User Guide (Brugervejledning til FISH på BOND)

Kreatech™ FISH Probları
DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND

Katalog No: KBI-XL015

Amaçlanan Kullanım

In vitro tanılama kullanımı içindir

BOND için DDIT3 (12q13) Break - XL, sarkomada formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş (FFPE) doku kesitlerinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Problar, otomatik bir BOND sistemi (BOND-MAX sistemi ve BOND-III sistemini kapsar) üzerinde BOND FISH Kit (DS9636) ile kullanılmalıdır.

BOND FISH probu için DDIT3 (12q13) Break - XL, FFPE dokularında DDIT3 geni bulunan genomik translokasyonları tespit eder. Prob, sarkoma dokularda valide edilmiştir. Herhangi bir boyamaya ya da boyama olmamasına ilişkin klinik yorumlama, morfolojik çalışmalarla ve doğru kontrollerle desteklenmeli ve nitelikli bir patolog tarafından hastanın klinik geçmişi ile diğer tanılama testleri göz önünde bulundurularak değerlendirilmelidir.

Özet ve Açıklama

Kreatech FISH Probları, formalinle fikse edilmiş parafin bloklarda saklanan dokular üzerinde floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) boyama prosedürü gerçekleştirmek üzere kullanılır. Uygun ön

tedavinin, Kreatech FISH Probları hibridizasyonunun ve BOND FISH kit kullanarak hibridizasyon sonrası sağlam bir yıkama işleminin ardından, doku kesitleri manuel olarak kurutulur ve DAPI ile monte edilir. Sonuçlar, önerilen filtrelerin uygun dalga boylarıyla kullanılması suretiyle, floresan mikroskopi ile yorumlanır.

Sağlanan Reaktifler

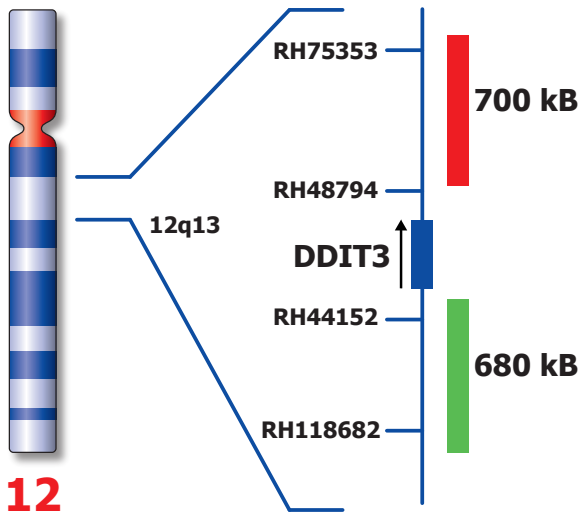
Ürün Açıklaması	Ürün No.	Hacim	Bileşim
DDIT3 (12q13) Proximal – XL	pKBI-XL015R	1 ml, 10x konsantrat	Platinum*Bright*™550 hibridizasyon tamponunda florofor etiketli DNA probları. Hibridizasyon tamponu, <%50 formamid içerir
DDIT3 (12q13) Distal – XL	pKBI-XL015G	1 ml, 10x konsantrat	Platinum*Bright*™495 hibridizasyon tamponunda florofor etiketli DNA probları. Hibridizasyon tamponu, <%50 formamid içerir

DDIT3 (12q13) Proximal - XL, DDIT3 gen bölgesindeki kırılma noktalarına yakın genomik bölgeleri tespit etmek için optimize edilmiştir.

DDIT3 (12q13) Distal - XL, DDIT3 gen bölgesindeki kırılma noktalarına uzak genomik bölgeleri tespit etmek için optimize edilmiştir.

Kombine iki prob, 12q13'te DDIT3 geni bulunan translokasyonları tespit etmek için kullanılır.

Tablo 1: Probların kilobaz çifti (kB), kromozom bandı ve STS marker'ları ile tanımlanan genom konumunda boyutunun gösterildiği kromozom haritası. Genin yanındaki ok, genin transkripsiyon yönünü gösterir. Yeşil DDIT3 (12q13) Distal - XL. Kırmızı DDIT3 (12q13) Proximal - XL. Kromozom haritaları hakkında daha fazla bilgi için Leica web sitesini ziyaret edin.



1) Haritalar ve konumlar, UCSC genome browser, build GRCh37/hg19, Feb.2009'a dayalıdır.

İhtiyaç Duyulan Fakat Sağlanmayan Malzemeler

BOND sistemini (BOND-MAX sistemini ve BOND-III sistemini kapsar) kullanarak numune tedavisi ve *in situ* hibridizasyon için gerekli olan malzemelerin tam listesi için BOND kullanıcı belgelerinde yer alan "BOND Reaktiflerinin Kullanımı" bölümüne bakınız.

BOND sisteminde (BOND-MAX sistemini ve BOND-III sistemini kapsar) Kreatech FISH Probları kullanarak uygun hasta malzemesinin analizi için Jenerik BOND reaktiflerinin yanı sıra özellikle aşağıdaki reaktifler gereklidir.

- BOND FISH kit (DS9636)

Kreatech FISH Probları, BOND FISH Kit (DS9636) ile bir arada (BOND-MAX sistemi ve BOND-III sistemini içeren) bir BOND sisteminde çalıştırılır. BOND sistemine BDZ v62 veya üstü ile birlikte önceden yüklenen *FISH Protocol D ile birlikte BOND FISH kit, FISH probunun BOND sisteminde çalıştırılması için gereklidir. Bu protokol, nükleik asit problarının spesifik olmayan hibridizasyonunu azaltmak amacıyla, hibridizasyon sonrası yıkama protokolü olarak tasarlanmıştır. BOND FISH kit, hibridizasyon sonrası yıkama tamponunu içerir ve tek bir kit 60 test için yeterlidir.

- BOND Hybridization solution (AR9037)

Problar, BOND Hybridization solution kullanılarak istenen yoğunluğa seyreltilecektir.

- BOND Enzyme Pretreatment kit (AR9551)

Optimum FISH sonuçları için ısıl ön işlem ile birlikte enzim sindirimi gereklidir.

- DAPI (örnek LK-095A veya LK-096A)

DAPI karşıt boyama, BOND sistemi üzerinde FISH protokolünün bir parçası olarak otomatik bir şekilde gerçekleştirilmez ve tercih edilen konsantrasyonda DAPI counterstain/antifade kullanılarak manuel bir şekilde yapılır.

Numuneler

Kreatech FISH Probları, ~5 µm kesilmiş FFPE dokuları üzerinde test edilmiştir. Doku blokları ve kesilen parçalar, optimum sonuçlar elde etmek için önerilen saklama ve işleme koşullarına uygun şekilde saklanmalıdır. Bkz. Leica web sitesi.

Fırınlama işlemi, ya BOND üzerinde *Bake and Dewax protocol kullanılarak ya da bir fırın ya da inkübatör yoluyla ayrı şekilde gerçekleştirilebilir. Önerilen pişirme sıcaklığı ve süresi, 56 °C'de 16 saate kadar ya da 80 °C'de 60-120 dakikadır.

Kullanım talimatları: Seyreltme ve Karıştırma

Kreatech FISH Probları, 10x konsantre biçimde sağlanır, BOND Hybridization Solution (AR9037) kullanılarak birleştirilir ve 1x nihai konsantrasyona seyreltilir.

Reaktif	Kullanılan Hacim (tavsiye edilen)
Prob 1 (10x) - Kırmızı	1,0 ml
Prob 2 (10x) - Yeşil	1,0 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml
Toplam hacim (1x son konsantrasyon)	10 ml
Test	40 teste kadar

Prob seyreltildikten sonra, karışım uygun bir BOND konteynerine (titrasyon konteyneri, 7 ml açık konteyner veya 30 ml açık konteyner, hazırlanan hacimlere bağlı olarak) ve BOND sistemine “DNA probe” olarak kaydedilir.

Titrasyon için seyreltileri hazırlarken, uygun BOND Açık Konteynırları (BOND Open Container) ölü hacmi için uygun yerin ayrıldığından emin olun (değerler için BOND kullanıcı belgelerine bakın). Bir flakondan gerçekleştirilen testlerin tam sayısı, kullanılan konteynerin ölü hacmine ve BOND sisteminin kalibrasyonuna bağlıdır.

1x dışındaki nihai konsantrasyonların kullanımı için Sorun Giderme bölümüne bakın.

Yeni reaktiflerin BOND sistemine (BOND-MAX sistemini ve BOND-III sistemini içerir) kaydedilmesi hakkında daha fazla bilgi için BOND kullanıcı belgelerinizde “Reaktif Yönetimi” bölümüne bakın.

Kullanım talimatları: Ön İşlem ve Protokoller

Kreatech FISH Probları, BOND FISH kit, BOND yardımcı reaktifleri ve Tablo 2'de gösterilen BOND ön işlem ve boyama protokolleri kullanılarak doğrulanmıştır. Kullanıcı tarafından kullanılan dokuya göre son protokol değişiklik gösterebilir. Belirtilen protokollerden yapılan tüm sapmalar, kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Tablo 2: Kreatech FISH Probları çalıştırma protokolleri

BOND Protokol Bölümü	Protokol Adı	Protokol Türü
Staining – ISH Detection	*FISH Protocol D	Hibridizasyon Sonrası
Prestaining - çıkarılması	*Dewax	Parafinin
Prestaining – Heat Pretreatment	HIER 25 min with ER2 (100) (1)	Isıl ön işleme, Epitop alma
Prestaining – Enzyme sindirme	*Enzyme 5 for 35 min (2)	Enzimatik
Prestaining – ISH denaturation	*D10	Denatürasyon 10 dk.
Prestaining – ISH detection	*ISH Hybridization (12Hr)	Hibridizasyon 12 sa.

(1) Ön tanımlı bir protokol değildir. Yeni bir protokol oluşturmak için BOND kullanıcı belgelerinizde "Protokoller" bölümüne başvurun.

(2) Enzyme 5, BOND Enzyme Pretreatment Kit (AR9551) içindeki mevcut Enzyme Concentrate 1'den elde edilmiştir. Özellikler için aşağıdaki Sorun Giderme bölümüne bakın.

Sinyal düzenleri

BOND için DDIT3 (12q13) Break - XL, FFPE dokularında DDIT3 geni bulunan translokasyonları tespit etmek için kullanılabilir.

Prob, Tablo 2'de gösterilen protokoller kullanılarak sarkoma dokularda valide edilmiştir.

BOND için DDIT3 (12q13) Break - XL, 12q13'te DDIT3 gen bölgesinin translokasyonlarını tespit etmek için çift renkli bir test olarak tasarlanmıştır. Normal sinyal paterni iki kırmızı/yeşil füzyon sinyalini (2F) gösterirken, DDIT3 geni bulunan bir translokasyon, standart kromozom 12 için bir füzyon sinyaline ve translokasyon (1F1R1G) için bir kırmızı ve bir yeşil sinyale yol açar.

Diğer tipik olmayan düzenlerle karşılaşılırsa takip testleri yapılması önerilir.

	Normal Sinyal Düzeyi	12q13 üzerinde DDIT3 geniyle ilgili Translo-kasyon
Öngörülen Düzen	2F	1F1R1G

Tabloda gösterilenler dışındaki sinyal paternlerinin yorumlanması için yerel veya genel kurallara bakınız.

Feragat: DDIT3 (12q13) Break – XL for BOND probunun performansı, bu prospektüste açıklanan prosedürler kullanılarak belirlenmiştir. Bu prosedürlerde yapılan değişiklikler, analizin performansını değiştirebilir. Belirtilen protokollerden yapılan tüm sapmalar, kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır

Saklama ve Stabilite

Probları güçlü ve doğrudan güneş ışığından koruyun.
2 - 8 °C sıcaklıkta saklayın. Açılmamış ürün, bu koşullar altında, flakon üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar stabil kalır.
Seyreltilmemiş reaktifi kullandıktan hemen sonra 2 - 8 °C'ye getirin. BOND konteynerinde saklanan, seyreltilmiş/karıştırılmış reaktif, çalıştırıldıktan sonra 2 - 8 °C'ye tekrar getirilmelidir.
Prob seyreltildikten sonra, prob karışımları 30 güne kadar stabil kalır. Bu sürenin sonunda, seyreltilmiş karışım standardın altında sonuçlar verebilir.
Probun kontamine olduğunu ve/veya stabil olmadığını belirten gözle görülür herhangi bir belirti yok.
Yukarıda belirtilenlerin dışındaki saklama koşulları kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Sorun Giderme

Ön işlem (aşırı sindirim): BOND kullanım talimatları Enzyme Pretreatment kit (AR9551) için BOND yazılımına *Enzyme 1 olarak kaydedilecek 7 ml Diluent içerisine 1 damla Enzyme Concentrate 1 ile seyreltme önerilir.
Bu *Enzyme 1, Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) ile birlikte kullanıldığında bazı numuneler için fazla güçlü gelerek aşırı sindirilmiş dokuyla sonuçlanabilir. *Enzyme 1'in (en fazla 1:300 seyreltme) ikinci kez seyreltilmesi ve herhangi bir karışıklığa sebebiyet vermemek için reaktifin BOND sistemine *Enzyme 5 olarak ayrıca kaydedilmesi

önerilir. Alternatif olarak, *Enzyme 1'in seri bir şekilde seyreltilmesi yerine, Enzyme concentrate 1 1:3000 oranına kadar doğrudan seyreltilebilir.

Prob seyreltme ve sinyal yoğunluğu: 1x son prob konsantrasyonunun kullanılması önerilir, fakat optimum prob dengesi doku yaşı, doku fiksasyonu, ön işlem protokolü ve kişisel tercih gibi faktörlere bağlıdır. Optimum konsantrasyonlar ve prob oranları değişiklik gösterebilir ve son kullanıcı tarafından deneysel olarak belirlenecektir.

Reaktif	Kullanılan hacim (önerilir)	Örneğin: Yeşil sinyal gücünü azaltma	
Prob 1 (10x) - Kırmızı	1,0 ml	1x Düzeyinde kırmızı:	1,0 ml
Prob 2 (10x) - Yeşil	1,0 ml	0,5x Düzeyinde Yeşil: 0,5 ml	0.5 ml
BOND Hybridization solution (AR9037)	8,0 ml		8.5 ml
1x son konsantrasyonda toplam hacim	10 ml		10 ml
Test sayısı	40 teste		40 teste

Herhangi bir olağan dışı boyama olması durumunda bunu bildirmek için yerel distribütörünüzle ya da Leica Biosystems bölge ofisinin müşteri hizmetleri ile iletişim kurun.

Ürüne Özgü Sınırlamalar

Önerilen test prosedürlerinin dışına çıkan kullanıcılar, hasta sonuçlarının bu koşullar altında yorumlanmasının sorumluluğunu üstlenmelidir. Doku türü, fiksasyon ve işleme farklılıkları nedeniyle protokol süreleri değişiklik gösterebilir. Bununla birlikte, BOND Enzim konsantrasyonu ve inkübasyon süresi doku türü, işleme ve fiksasyon koşullarına bağlı olarak optimizasyon gerektirebilir.

Daha Fazla Bilgi

BOND reaktifleriyle *in situ* hibridizasyon hakkında daha fazla bilgi için BOND kullanıcı belgelerini inceleyin.

Uyarılar ve Önlemler

- Bu ürün, yalnızca *in vitro* tanılama kullanımı içindir
- Yalnızca laboratuvarda/profesyonel kullanım içindir
- Kreatech FISH Probları, yalnızca BOND sistemlerinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır.
  Reaktifleri ambalaj etiketinde verilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın
  Uygun koruyucu kıyafet, eldiven ve göz/yüz koruyucuları kullanın Kreatech FISH Probları formamid içerir ve bu nedenle de BOND yazılımına tehlikeli atık olarak kaydedilmelidir
- Formamid, insanların üremesi üzerinde olumsuz etkiye sahip olabilir. Solumaktan, yemekten ya da koruyucu kullanmadan cilde temas etmesinden kaçının. Ciltle temas meydana gelirse en az 15 dakika boyunca bolca suyla yıkayın

TEHLIKE

FORMAMID

Tehlike Bildirimi

H360D Doğmamış çocukta hasara yol açabilir.

Önlem Amaçlı Bildirimler

P201 Özel kullanım talimatları alın.

P280 Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/koruyucu gözlük/koruyucu maske kullanın.

P308 + P313 Maruz kalınma veya etkileşme halinde: Tıbbi yardım/bakım alın.

P405 Kilitli olarak saklayın.

P501 Ürün içeriğini/kabını, yetkili kimyasal atık tesislerinde bertaraf edin veya organikse, yüksek sıcaklıkta yakarak imha edin.

- Tüm ayrıntılar için SDS'ye danışın. Güvenlik Veri Sayfasının bir kopyasını almak için yerel distribütörünüzle ya da Leica Biosystems'in bölge ofisiyle iletişime geçin. Güvenlik Veri Sayfaları Leica Biosystems web sitesinde (www.LeicaBiosystems.com) bulunur Fiksasyon öncesi ve sonrasında numuneler, onlara maruz kalan tüm malzemeler ve arta kalan prob hacmi, enfeksiyon taşıyabileceği göz önünde bulundurularak taşınmalı ve gerekli önlemler alınarak imha edilmelidir
- Reaktifleri ağzınızı kullanarak pipetle çekmeyin; deri ve mukoza

zarının reaktifler veya numunelerle ile temasından kaçının
- Reaktiflerin veya numunelerin hassas bölgelere temas etmesi durumunda, bol su ile yıkayın. Tıbbi yardım alın
- Uygun tek kullanımlık malzemeleri kullanarak döküntüleri hemen temizleyin
- Tüm malzemeler, yerel mevzuata uygun bir biçimde bertaraf edilmelidir.
- Belirtilenlerin dışında alma adımları, inkübasyon süreleri ve sıcaklıkları kullanıldığında hatalı sonuçlara sebebiyet verilebilir. Bu tür farklılıklar kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır

Kaynakça

1. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule 57 FR 7163 February 28, 1992.
2. Villanova PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. 1991; 7(9). Order code M29-P.
3. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: Wilkinson DG. (ed.) *in situ* Hybridization. A practical approach. 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 1998, pp.1 - 13.
4. FISH on BOND User Guide (FISH on BOND Kullanıcı Kılavuzu)

LeicaBiosystems.com

DANGER

FORMAMIDE

IVD

2°C

8°C
long
term
storage

Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
The Netherlands
www.LeicaBiosystems.com

For detailed information about European sales offices, please visit our website: **LeicaBiosystems.com**

Patents: These products or the use of these products is subject to proprietary rights. The probes in these products are produced using the Janssen Diagnostics, LLC REPEAT- FREE™ technology and labeled with the Universal Linkage System (ULS™).

The ULS™ technology and products are covered by one or more of the following US patents 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566; 6,133,038; US RE 40,557E, 6,797,818; 7,217,813. KREATECH is a trade name of KREATECH Biotechnology BV. ULS™, PlatinumBright™, are trademarks of KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ is a trademark of Janssen Diagnostics, LLC.

KBI-XL015 Rev A 21/11/2019 • Copyright © by Leica Biosystems, Amsterdam, 2014. Subject to modifications. LEICA and the Leica Logo are registered trademarks of Leica Microsystems IR GmbH.