

Risoluzione Problemi

Problemi	Causa Potenziale	Soluzione Raccomandata
Non sono presenti segnali FISH visibili al microscopio.	<ul style="list-style-type: none"> Otturatore luce riflessa chiuso/ slitta presente sul percorso luminoso. La lampada a fluorescenza è spenta. Filtro selezionato non corretto. Obiettivo fuori posizione. Il fototubo è in posizione camera. 	<ul style="list-style-type: none"> Aprire l'otturatore/ spostare la slitta dal percorso luminoso. Accendere la lampada a fluorescenza. Posizionare il filtro corretto sul percorso luminoso. Spostare l'obiettivo nella posizione corretta. Posizionare il percorso luminoso per gli oculari.
I segnali di ibridizzazione si attenuano in poco tempo.	<ul style="list-style-type: none"> Olio da immersione presente tra vetrino e copri-oggetto. 	<ul style="list-style-type: none"> Cambiare il copri-oggetto e rimettere il DAPI/Antifade. Usare un copri-oggetto 24x32 mm² anche se è stata ibridizzata una piccola regione.
Segnali diffusi.	<ul style="list-style-type: none"> Il preparato non è adeguatamente illuminato. Il piano focale non può essere adeguatamente regolato. Lo strato di Antifade è troppo spesso per la messa a fuoco. 	<ul style="list-style-type: none"> Controllare il percorso ottico del microscopio. Regolare l'illuminazione UV. Controllare il tempo di utilizzo della lampada UV. Utilizzare il corretto volume di olio da immersione. Utilizzare un olio da immersione adeguato per la fluorescenza. Non usare eccessive quantità di DAPI/Antifade. 10µl per vetrino sono sufficienti (con coprioggetto. 24 x 32 mm²).
Segnali deboli.	<ul style="list-style-type: none"> Campione troppo vecchio. La denaturazione dei cromosomi non è adeguata. Si sta utilizzando un filtro multibanda. 	<ul style="list-style-type: none"> I campioni non dovrebbero essere più vecchi di due settimane. L'invecchiamento, l'essiccamento in stufa o eccessiva fissazione possono inibire l'ibridizzazione e non sono raccomandati; si raccomanda di aumentare la T di denaturazione fino a 80 °C. Utilizzare un filtro a singola banda.
Segnali Aqua o Green deboli o fondo diffuso nel canale del Green.	<ul style="list-style-type: none"> L'intensità del DAPI è troppo elevata e causa <i>cross-talk</i> con l'AQUA o il GREEN. pH delle soluzioni di lavaggio troppo basso. 	<ul style="list-style-type: none"> Utilizzare DAPI/Antifade a concentrazioni minori. Assicurarsi che il valore di pH sia compreso tra 7.0 - 7.5. Alcuni fluorofori green sono molto sensibili a valori di pH inferiori a 7.
Elevato fondo aspecifico.	<ul style="list-style-type: none"> Le proteine citoplasmatiche residue possono influire negativamente sull'ibridizzazione. 	<ul style="list-style-type: none"> Pre-trattare i vetrini con la Pepsina.
Se le raccomandazioni elencate non risolvono il problema, oppure il problema non è indicato, si prega di contattare MetaSystems Italia.		

Assistenza Clienti

Si prega di contattare MetaSystems s.r.l. a socio unico (i contatti sono indicati di seguito).
MetaSystems Probes, in qualità di produttore, non riconosce alcun interesse proprietario nei marchi e nei nomi di terze parti.

MetaSystems s.r.l. a socio unico
Via Gallarate, 80
20151 Milano
Italia
Tel.: +39 0245375300
Fax: +39 0245375303
e-mail: customer_care@metasystems-italy.com
URL: www.metasystems-probes.com/it

Simboli Usati

Simbolo	Descrizione		
	Questo prodotto è conforme ai requisiti della direttiva 98/79 CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro.		Tutti i pericoli sono contrassegnati da un triangolo di avvertimento con un punto esclamativo. A seconda del carattere, possono essere integrati con le parole ATTENZIONE o CAUTELA.
	Per uso diagnostico in vitro.		
	Produttore		N. di Riferimento
	N. di test		N. di Lotto
	Data di scadenza		Limiti di intervallo della temperatura di conservazione; sono indicati il limite inferiore e superiore.

Revision: IT-General-RevA200129-200715v10.1

MetaSystems Probes GmbH
1. Industriest. 7, 68804 Altlußheim,
Germany, Tel.: +49 (0)6205 292760



FORMAMIDE
Danger. May damage the unborn child. Suspected of causing cancer. May cause damage to organs through prolonged/repeated exposure. Obtain special instructions before use. Do not breathe vapours. Wear protective gloves/protective clothing. IF exposed or concerned: Get medical advice.

Gefahr. Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich Krebs erzeugen. Kann die Organe schädigen bei längerer/wiederholter Exposition. Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Dampf nicht einatmen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung tragen. Bei Exposition oder Verdacht: Ärztlichen Rat einholen.

Pericolo. Può danneggiare il feto. Può provocare il cancro. Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata/ripetuta. Seguire istruzioni speciali prima dell'uso. Non respirare i vapori. Indossare guanti/indumenti protettivi. IN CASO di esposizione o sospetto: consultare un medico.



XCyting Locus-Specific Probes

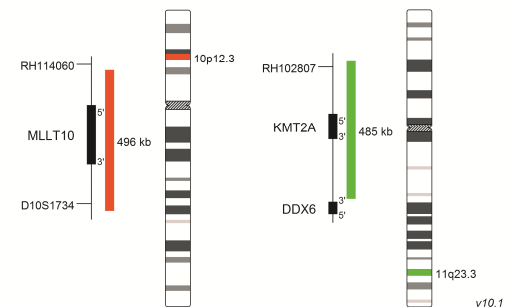
Per Utilizzo Professionale

Ulteriori informazioni sono disponibili su www.metasystems-probes.com

Prodotto	Marcatura	Codice prodotto	Confezione
XL t(10;11) MLLT10/KMT2A DF	orange/green	D-5134-100-OG	100µl

La XL t(10;11) MLLT10/KMT2A DF è disegnata come sonda dual fusion. La sonda marcata in arancio si estende sul punto di rottura 10p12.3 (MLLT10) e la sonda marcata in verde si estende sull'altro punto di rottura al 11q23.3 (KMT2A).

Schema della sonda:



Cromosoma 10 Cromosoma 11

Materiali Forniti

100µl di XL t(10;11) MLLT10/KMT2A DF, la sonda è disciolta in una soluzione di ibridizzazione pronta all'uso.

Destinazione d'Uso

Le sonde FISH a DNA sono progettate per l'analisi delle aberrazioni cromosomiche su cellule fissate prelevate da campioni umani attraverso la metodica dell'ibridizzazione in situ fluorescente (fluorescence in-situ hybridization o FISH) utile negli studi di Citogenetica. L'ibridizzazione di nuclei interfascici e/o di metafasi con sonde FISH consente l'analisi della struttura dei cromosomi o della variazione del loro numero di copie, allo scopo di individuare alterazioni genetiche acquisite, definite come dalla Nomenclatura Internazionale sui Dispositivi Medici CT929 (Global Medical Device Nomenclature - GMDN). L'analisi FISH è impiegata a supporto di altre metodiche diagnostiche e non deve essere l'unica fonte informativa per decisioni terapeutiche o diagnostiche.

Istruzioni di sicurezza

Tutte le sonde prodotte da MetaSystems Probes sono esclusivamente per uso professionale e devono essere usate solo da personale qualificato e opportunamente addestrato. Per garantire la sicurezza operativa e risultati riproducibili, si prega di osservare gli avvisi di sicurezza e i segnali di cautela descritti di seguito.

	CAUTELA: La formammide è tossica ed è un potenziale agente teratogeno! Le sonde MetaSystems contengono formammide. La formammide è tossica e teratogena. Può causare danni al feto. Non inalare i vapori; evitare che entri in contatto con la pelle! Indossare guanti e camice da laboratorio. In caso di contatto con pelle oppure occhi, lavare immediatamente con acqua.
	CAUTELA: Bagno ad acqua calda e piastre riscaldanti! Per la denaturazione e l'ibridizzazione vengono utilizzati bagni ad acqua calda e piastre riscaldanti a temperature >37°C. Prestare attenzione a non entrare in contatto diretto con superfici o liquidi caldi. Indossare guanti e camice da laboratorio. In caso di contatto con pelle, lavare immediatamente con acqua fredda.
	ATTENZIONE: Pratiche di Laboratorio! Utilizzare seguendo i comuni principi delle buone pratiche di Laboratorio o, se ne siete in possesso, delle linee guida GLP (<i>Good Laboratory Practice</i>).
	ATTENZIONE: Indicazioni per lo smaltimento! Tutti i materiali pericolosi devono essere smaltiti in accordo con la regolamentazione locale/ nazionale in materia di smaltimento dei rifiuti pericolosi.

Conservazione e Gestione

Le sonde devono essere conservate al buio a -20°C (±5°C). Le prestazioni della sonda sono risultate inalterate per un massimo di 20 cicli di congelamento/ scongelamento.

Spedizione

Le sonde MetaSystems a DNA vengono spedite a temperatura ambiente.

Strumentazione necessaria ma non fornita

- Bagno termostato con controllo accurato della temperatura
 - Piastra riscaldante a 75°C (±1°C), a piastra solida e controllo accurato della temperatura fino a 80°C
 - Freezer a -20°C (±5°C)
 - Olio ad immersione per fluorescenza, raccomandato dal produttore del microscopio
 - Adeguato sistema di Analisi d'Immagine, es. MetaSystems Isis
 - Copri-oggetto (vetro): 22 x 22 mm² e 24 x 32 mm²
 - Collante per vetrini
 - DAPI/Antifade
 - Microscopio a fluorescenza con filtri adeguati (vedere di seguito)
 - Microscopio a fluorescenza con filtri adeguati (vedere di seguito)
- Micropipette calibrate con volumi variabili, compresi tra 1 µl e 1 ml
 - Termometro
 - Camera umida a 37°C (±1°C)
 - Pinzette
 - Guanti
 - Microcentrifuga
- pH-metro calibrato
 - Timer
 - Portavetrini Coplin (in vetro o plastica)

Raccomandazioni per il Microscopio a Fluorescenza

- Illuminazione a fluorescenza: sistema di illuminazione ad alogenuri metallici oppure illuminatori a mercurio da 100 watt.
- Obbiettivi dedicati all'illuminazione in epi-fluorescenza.
- Filtri per fluorescenza: per la visualizzazione/ conteggio dei segnali, utilizzate un filtro MetaSystems a tripla banda o a quattro bande, oppure un filtro a singola banda a banda stretta. Per l'acquisizione delle immagini utilizzate, invece, filtri a singola banda a banda stretta specifici per i rispettivi fluorocromi. Non esitate a chiedere informazioni.

Specifiche dei fluorocromi

Marcatura	Assorbanza massima	Emissione massima
Aqua	426 nm	480 nm
Green	505 nm	530 nm
Orange	552 nm	576 nm

Preparazione del Campione

Commenti Generali

- Le sonde MetaSystems sono disegnate per essere utilizzate su campioni di citogenetica fissati in metanolo/acido acetico 3:1 e devono essere preparate in accordo con le linee guida del laboratorio o dell'Ente di appartenenza.
- Preparate i campioni seguendo le procedure standard di citogenetica.

Stabilità dei Vetrini Ibrizzati

- I vetrini FISH ibridizzati possono essere analizzati per almeno 6 mesi se conservati al buio a -20°C (±5°C).

Raccomandazioni Aggiuntive per la Procedura

- Vi raccomandiamo vivamente l'impiego di un termometro calibrato per la misurazione della temperatura delle soluzioni, del bagnomaria e degli incubatori, in quanto le corrette temperature sono fattori critici per ottenere risultati ottimali.
- Controllate attentamente la temperatura delle soluzioni preriscaldate.
- Controllate attentamente il pH delle soluzioni.
- La concentrazione delle soluzioni di lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura sono parametri importanti, poiché una bassa stringenza può risultare in un legame aspecifico della sonda, mentre un'elevata stringenza può causare la perdita dei segnali.
- Prima dell'apertura:** Centrifugate brevemente per raccogliere la sonda sul fondo della provetta.

Protocollo FISH per Sonde a DNA MetaSystems

Preparazione del vetrino

- Posizionate la goccia di campione cellulare su un vetrino da microscopia pulito. Lasciatelo asciugare all'aria. Se non dovete usarlo lo stesso giorno, conservate il vetrino a -20°C (±5°C).
- Applicate 10 µl di sonda
- Coprite con un copri-oggetto 22 x 22 mm².
- Sigillate con collante per vetrini (es. rubber cement).

Denaturazione

- Co-denaturate campione e sonda utilizzando una piastra riscaldante a 75°C (±1°C) **per 2 min**.

Ibridizzazione

- Incubate il vetrino in camera umidificata a 37°C (±1°C) *overnight*.

Lavaggi Post-Ibridizzazione

Soluzioni necessarie

- SSC 0.4X (pH 7.0 – 7.5) a 72°C (±1°C)
- SSC 2X, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) a temperatura ambiente

Procedura

- Rimuovete con cura il copri-oggetto e tutte le tracce di collante.
- Lavate il vetrino in SSC 0.4X (pH 7.0) a 72°C (±1°C) **per 2 min**.
- Sgocciolate il vetrino e lavatelo in SSC 2X, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) a temperatura ambiente **per 30 secondi**.
- Risciacquate rapidamente in acqua distillata per evitare la formazione di cristalli e lasciatelo asciugare all'aria.

Controcolorazione

Soluzioni necessarie:

- DAPI/antifade (es. il DAPI/Antifade MetaSystems ha codice D-0902-500-DA)

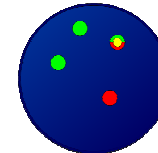
Procedura:

- Applicate 10 µl di DAPI/Antifade e coprite con un copri-oggetto 24 x 32 mm².
- Consentite al DAPI/Antifade di penetrare nel vostro campione **per 10 min**.
- Procedete con l'analisi al microscopio.
- Conservate il vetrino a -20°C (±5°C). I segnali di ibridizzazione permangono stabili per almeno sei mesi.

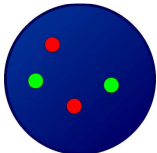
Risultati Attesi

Devono verificarsi riarrangiamenti genomici complessi per creare un gene di fusione KMT2A / MLLT10, cosiddetto "in-frame". Sono necessarie almeno 3 rotture cromosomiche per produrre la fusione patologica 5'KMT2A / 3'MLLT10. La maggior parte dei casi mostra un cariotipo anormale; inoltre, possono verificarsi aberrazioni criptiche.

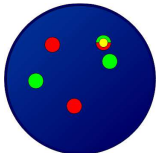
Cellula Aberrante (risultato tipico): Due segnali green (2G), un segnale orange (1O) ed un segnale green-orange di colocalizzazione/fusione (1GO), come conseguenza di un'inserzione di parti della regione cromosomica marcata in green all'interno della regione marcata in orange.



Cellula Normale: Due segnali green (2G) e due segnali orange (2O).



Cellula Aberrante (risultato tipico): Due segnali green (2G), due segnali orange (2O) ed un segnale green-orange di colocalizzazione/fusione (1GO), come conseguenza di riarrangiamenti complessi che interessano i rispettivi loci.



Vengono mostrate solamente le combinazioni di segnali più frequenti; tuttavia potrebbero osservarsene di ulteriori, differenti da quelle visualizzate.