

MetaSystems Probes GmbH  
 1. Industriest. 7, 68804 Altlussheim,  
 Germany, Tel: +49 (0)6205 292160



**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.

**XA 13/18/21**  
Sonda per Aneusomie  
100µl (V<sub>10</sub>)

**REF** D-5607-100-TC 20

LOT XXXXX  
YYYY-MM

-25°C / -15°C

**2797**

## XCyting AneuScore Probes

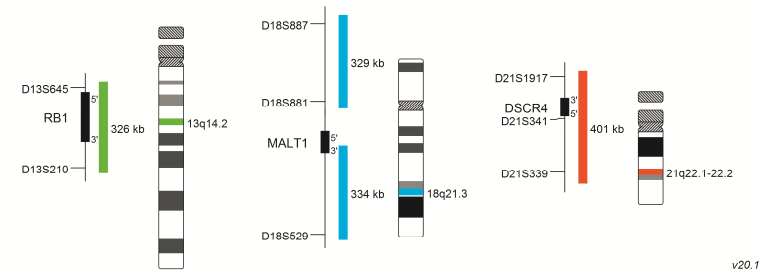
**Per Utilizzo Professionale**

Ulteriori informazioni sono disponibili su [www.metasystems-probes.com](http://www.metasystems-probes.com)

Prodotto	Marcatura	Codice prodotto	Confezione
XA 13/18/21	green/blue/orange	D-5607-100-TC	100µl

La XA 13/18/21 è un mix di sonde specifiche che consente di identificare le aneuploidie dei cromosomi 13, 18 e 21. La sonda marcata in verde ibridizza la regione al 13q14 includendo il locus RB1; la sonda locus-specifica marcata in blu ibridizza il locus 18q21 superando l'ostacolo dell'eteromorfismo del centromero del cromosoma 18; la sonda marcata in arancio ibridizza al 21q22 includendo la regione DSCR4 (Down Syndrome Critical Region 4).

Schema della sonda:



Cromosoma 13, Cromosoma 18 e Cromosoma 21

## Materiali Forniti





100µl (∇ 10), XA 13/18/21 è disciolta in una soluzione di ibridizzazione e pronta all'uso.

## Destinazione d'Uso

Tutte le sonde FISH a DNA prodotte da MetaSystems Probes sono da intendersi esclusivamente per uso di laboratorio in esperimenti di ibridizzazione *in-situ* fluorescente (FISH) finalizzati ad indagini di natura citogenetica. XA 13/18/21 consente la diagnosi ed il monitoraggio di anomalie cromosomiche di natura costituzionale, ossia presenti in tutte le cellule del corpo (in accordo alla " *Global Medical Device Nomenclature*" (GMDN) CT 826). Il test FISH fornito deve essere impiegato per fornire informazioni aggiuntive a quanto già determinato attraverso altri test, come ad esempio il cariotipo di cellule fetali, e ma da solo. XA 13/18/21 non è da intendersi per l'identificazione di riarrangiamenti strutturali (es. traslocazioni) o anomalie numeriche di altri cromosomi.

## 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.

	<b>CAUTELA: La formammide è tossica ed è un potenziale agente teratogeno!</b> 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.
	<b>CAUTELA: Bagno ad acqua calda e piastre riscaldanti!</b> 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.
	<b>ATTENZIONE: Pratiche di Laboratorio!</b> 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> ).
	<b>ATTENZIONE: Indicazioni per lo smaltimento!</b> 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
- Microscopio a fluorescenza con filtri adeguati (vedere di seguito)
- Micropipette calibrate con volumi variabili, compresi tra 1 µl e 1 ml
- Freezer a -20°C (±5°C)
- Olio ad immersione per fluorescenza, raccomandato dal produttore del microscopio
- Termometro
- Camera umida a 37°C (±1°C)
- Adeguato sistema di Analisi d'Immagine, es. MetaSystems Isis
- pH-metro calibrato
- Pinzette
- Copri-oggetto (vetro): 22 x 22 mm<sup>2</sup> e 24 x 32 mm<sup>2</sup>
- Timer
- Guanti
- Collante per vetrini
- Portavetrini Coplin (in vetro o plastica)
- Microcentrifuga
- DAPI/Antifade

## 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

## 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

Revision: IT-XA-RevA200129-200220v20.1

## Risoluzione Problemi

Problemi	Causa Potenziale	Soluzione Raccomandata
Non sono presenti segnali FISH visibili al microscopio.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Otturatore luce riflessa chiuso/ slitta presente sul percorso luminoso.</li> <li>La lampada a fluorescenza è spenta.</li> <li>Filtro selezionato non corretto.</li> <li>Obiettivo fuori posizione.</li> <li>Il fototubo è in posizione camera.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aprire l'otturatore/ spostare la slitta dal percorso luminoso.</li> <li>Accendere la lampada a fluorescenza.</li> <li>Posizionare il filtro corretto sul percorso luminoso.</li> <li>Spostare l'obiettivo nella posizione corretta.</li> <li>Posizionare il percorso luminoso per gli oculari.</li> </ul>
I segnali di ibridizzazione si attenuano in poco tempo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Olio da immersione presente tra vetrino e copri-oggetto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cambiare il copri-oggetto e rimettere il DAPI/Antifade. Usare un copri-oggetto 24x32 mm<sup>2</sup> anche se è stata ibridizzata una piccola regione.</li> </ul>
Segnali diffusi.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Il preparato non è adeguatamente illuminato.</li> <li>Il piano focale non può essere adeguatamente regolato.</li> <li>Lo strato di Antifade è troppo spesso per la messa a fuoco.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Controllare il percorso ottico del microscopio. Regolare l'illuminazione UV. Controllare il tempo di utilizzo della lampada UV.</li> <li>Utilizzare il corretto volume di olio da immersione. Utilizzare un olio da immersione adeguato per la fluorescenza.</li> <li>Non usare eccessive quantità di DAPI/Antifade. 10µl per vetrino sono sufficienti (con coprioggetto. 24 x 32 mm<sup>2</sup>).</li> </ul>
Segnali deboli.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Campione troppo vecchio.</li> <li>La denaturazione dei cromosomi non è adeguata.</li> <li>Si sta utilizzando un filtro multibanda.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>I campioni non dovrebbero essere più vecchi di due settimane.</li> <li>L'invecchiamento, l'essiccamento in stufa o eccessiva fissazione possono inibire l'ibridizzazione e non sono raccomandati;</li> <li>si raccomanda di aumentare la T di denaturazione fino a 80 °C.</li> <li>Utilizzare un filtro a singola banda.</li> </ul>
Segnali Aqua o Green deboli o fondo diffuso nel canale del Green.	<ul style="list-style-type: none"> <li>L'intensità del DAPI è troppo elevata e causa <i>cross-talk</i> con l'AQUA o il GREEN.</li> <li>pH delle soluzioni di lavaggio troppo basso.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Utilizzare DAPI/Antifade a concentrazioni minori.</li> <li>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.</li> </ul>
Elevato fondo aspecifico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Le proteine citoplasmatiche residue possono influire negativamente sull'ibridizzazione.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pre-trattare i vetrini con la Pepsina.</li> </ul>
Se le raccomandazioni elencate non risolvono il problema, oppure il problema non è indicato, si prega di contattare MetaSystems Italia.		

## Simboli Usati

Simbolo	Descrizione
	Questo prodotto è conforme ai requisiti della direttiva 98/79 CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro.
	Per uso diagnostico in vitro.
	Produttore
	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.
	N. di Riferimento
	N. di Lotto
	Limiti di intervallo della temperatura di conservazione; sono indicati il limite inferiore e superiore.
	Questo simbolo indica il numero di test.
	Data di scadenza

## Preparazione del Campione

### Materiale richiesto (non fornito):

- Acqua bidistillata,
- Tripsina/EDTA (0.05% Tripsina, 0.02% EDTA\*4Na in soluzione salina tamponata di Hank senza Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, a 37°C),
- KCl 0.075 M, a 37°C,
- Fissativo di Carnoy (3:1 Metanolo/Acido Acetico, preparato a fresco, a -20°C),
- Vetrini per microscopia,
- SSC 2X a 37°C,
- Serie di Etanoli: 100%, 95%, 70%, a temperatura ambiente.

### Procedura:

- Centrifugate 2-5 ml di liquido amniotico (senza sangue) per 8 minuti a 1000 rpm.
- Rimuovete il sopranatante e risospesdate il pellet picchiando delicatamente sul fondo della provetta.
- Aggiungete 5 ml di Tripsina/EDTA e incubate per 30 minuti a 37°C (±1°C).
- Centrifugate per 8 minuti a 1000 rpm, rimuovete il sopranatante e risospesdate il pellet picchiando delicatamente sul fondo della provetta.
- Aggiungete 5 ml di KCl 0.075 M e incubate per 20 minuti a 37°C (±1°C).
- Aggiungete lentamente 2 ml di fissativo preparato a fresco (3:1 Metanolo/Acido Acetico, a -20°C) e mescolate.
- Centrifugate per 8 minuti a 1000 rpm, rimuovete il sopranatante e risospesdate il pellet picchiando delicatamente sul fondo della provetta.
- Aggiungete 5 ml di fissativo e incubate per 30 minuti in frigorifero (2°C-6°C).
- Centrifugate per 8 minuti a 1000 rpm, rimuovete il sopranatante e dissolvete il pellet picchiando delicatamente sul fondo della provetta.
- Aggiungete 50-100 µl di fissativo e risospesdate delicatamente il pellet.
- Gocciolate 10 µl di sospensione cellulare per area su un vetrino pulito privo di polvere (potete segnare l'area con una penna a punta diamantata). Si ottengono risultati ottimali a 20-25°C con umidità pari al 45-55%. Lasciate asciugare all'aria a temperatura ambiente e controllate la densità cellulare utilizzando un microscopio a contrasto di fase.
- Se la densità cellulare è troppo bassa, aggiungete altri 10 µl di sospensione cellulare e lasciate asciugare all'aria.
- Incubate il vetrino per 15-30 minuti in SSC 2X a 37°C (±1°C).
- Disidratate utilizzando Etanolo a concentrazioni crescenti (70%, 95%, e 100%) per 2 minuti ciascuno. Lasciate che il vetrino si asciughi all'aria.
- Procedete seguendo il protocollo specifico per il kit di sonde FISH pre-natali fornito con la sonda o il set di sonde.

### Commenti Generali

- Le sonde MetaSystems sono disegnate per essere utilizzate su campioni di citogenetica fissati in fissativo di Carnoy 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 Ibridizzati

- 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

1. 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  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ).
2. Applicare 10  $\mu\text{l}$  di sonda
3. Coprite con un copri-oggetto 22 x 22  $\text{mm}^2$ .
4. Sigillate con collante per vetrini (es. rubber cement).

### Denaturazione

1. Co-denurate campione e sonda utilizzando una piastra riscaldante a  $75^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) per **2 min.**

### Ibridizzazione

1. Incubate il vetrino in camera umidificata a  $37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) *overnight*.

### Lavaggi Post-Ibridizzazione

#### Soluzioni necessarie

- SSC 0.4X (pH 7.0 – 7.5) a  $72^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ )
- SSC 2X, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) a temperatura ambiente

#### Procedura

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

### Controcolorazione

#### Soluzioni necessarie:

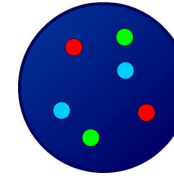
- DAPI/antifade (es. il DAPI/Antifade MetaSystems ha codice D-0902-500-DA)

#### Procedura:

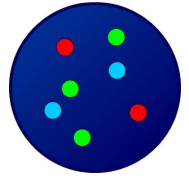
1. Applicare 10  $\mu\text{l}$  di DAPI/Antifade e coprite con un copri-oggetto 24 x 32  $\text{mm}^2$ .
2. Consentite al DAPI/Antifade di penetrare nel vostro campione per **10 min.**
3. Procedete con l'analisi al microscopio.
4. Conservate il vetrino a  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ). I segnali di ibridizzazione permangono stabili per almeno sei mesi.

### Risultati Attesi

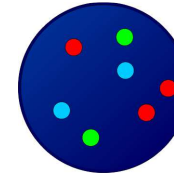
Cellula Normale:  
Due segnali green (2G), due orange (2O) e due segnali blu (2B).



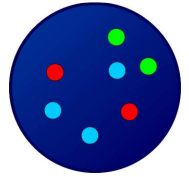
Cellula Aberrante:  
Trisomia 13  
Tre segnali green (3G), due orange (2O) e due segnali blu (2B).



Cellula Aberrante:  
Trisomia 21  
Due segnali green (2G), tre orange (3O) e due segnali blu (2B).



Cellula Aberrante:  
Trisomia 18  
Due segnali green (2G), due orange (2O) e tre segnali blu (3B).



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