

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 respirarne i vapori. Indossare guanti/indumenti protettivi. IN CASO di esposizione o sospetto: consultare un medico.

XCyting AneuScore Probes

Per Utilizzo Professionale

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

Prodotto	Marcatura	Codice prodotto	Confezione
XA AneuScore III	orange/green/blue	D-5613-500-TC	2x (5x100µl)

Il Kit di sonde XA AneuScore III è un mix di sonde, fornito in 2 vial separate, specifico per l'identificazione delle aneuploidie dei cromosomi 13, 18, 21 X e Y.

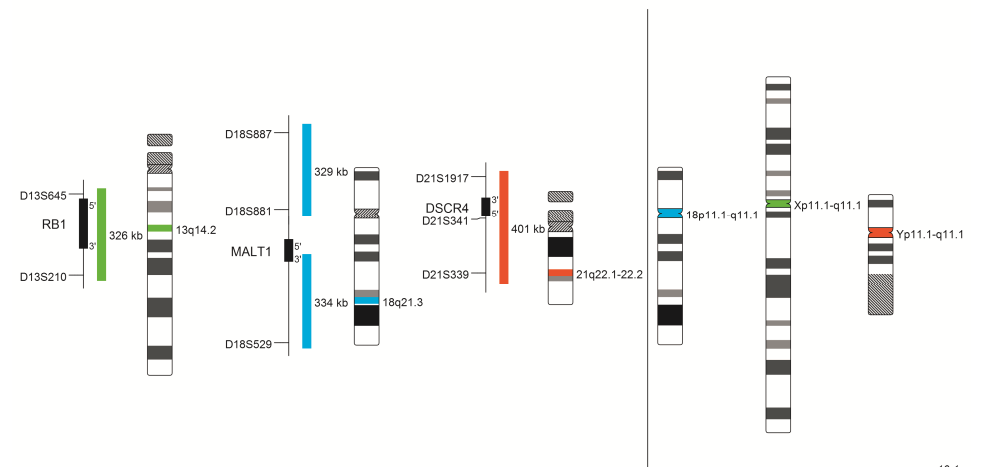
XA 13/18/21 (D-5607-100-TC):

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 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).

XA X/Y/18 (D-5606-100-OG):

La XA X/Y/18 è un mix di sonde specifiche che consente di identificare le aneuploidie dei cromosomi X, Y e 18. La combinazione di sonde è composta da sequenze ripetute che ibridizzano sulle regioni centromeriche dei cromosomi X, Y e 18 e sono marcate in verde, arancio e blu, rispettivamente.

Schema della sonda:



XA 13/18/21 (LOT XXXXX) e XA X/Y/18 (LOT XXXXX)

Materiali Forniti





2x (5x100µl) (√ 2x50), XA 13/18/21 e XA X/Y/18 vengono fornite in vial separate, allo scopo di essere utilizzate in reazioni di ibridizzazioni differenti. Le sonde sono disciolte in una soluzione di ibridizzazione e sono pronte 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 AneuScore III 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 AneuScore III 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.

	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
- 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 mm² e 24 x 32 mm²
- 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.
- Obiettivi 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

Marchatura	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-RevA200129-200220v10.1

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.		

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 Ca²⁺ e Mg²⁺, 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 soprannatante 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 soprannatante 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 soprannatante 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 soprannatante 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°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$).
2. Applicare 10 μl di sonda
3. Coprite con un copri-oggetto 22 x 22 mm².
4. Sigillate con collante per vetrini (es. rubber cement).

Denaturazione

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

Ibridizzazione

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

Lavaggi Post-Ibridizzazione

Soluzioni necessarie

- SSC 0.4X (pH 7.0 – 7.5) a 72°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°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 μl di DAPI/Antifade e coprite con un copri-oggetto 24 x 32 mm².
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°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$). I segnali di ibridizzazione permangono stabili per almeno sei mesi.

Risultati Attesi

XA 13/18/21

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



XA 13/18/21

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



XA X/Y/18

Cellula Normale, maschio: Un segnale green (1G), un orange (1O) e due segnali blu (2B).



XA X/Y/18

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



XA X/Y/18

Cellula Aberrante, maschio: 47,XXY; due segnali green (2G), un orange (1O) e due segnali blu (2B).



XA X/Y/18

Cellula Aberrante, femmina: 45,XO; un segnale green (1G) e due blu (2B).



XA 13/18/21

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



XA 13/18/21

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



XA X/Y/18

Cellula Aberrante, maschio: Trisomia 18; un segnale green (1G), un orange (1O) e tre segnali blu (3B).



XA X/Y/18

Cellula Aberrante, femmina: Trisomia 18; due segnali green (2G) e tre blu (3B).



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