

Terreni di coltura “Amniochrome”

ISTRUZIONI PER L'USO

| | | |
|--|---------------------------------|--------|
| Amniochrome™ Plus | 02-026E | 100 ml |
| | 02-026F | 500 ml |
| Amniochrome™ Pro | 02-035E | 100 ml |
| | 02-035F | 500 ml |
| Amniochrome™ II Modified Complete Media System | 12-756EZM | 100 ml |
| | (formato da 12-756E + 17-524ZM) | |
| | 12-756FCM | 500 ml |
| | (formato da 12-756F + 17-524CM) | |

ATTENZIONE

Manipolare secondo le norme di bio-sicurezza in vigore

Caratteristiche del prodotto

Utilizzo del prodotto

Il prodotto **Amniochrome** è destinato alla coltura primaria di cellule provenienti da liquido amniotico umano (AFC) e da campioni di villi coriali (CVS) nell'ambito di procedure diagnostiche in vitro. La finalità delle colture è di ottenere cloni cellulari adatti all'analisi del cariotipo, come pure a metodiche di ibridazione fluorescente in situ (FISH) ed altre procedure di uso comune in citogenetica. Il prodotto viene sottoposto a rigidi controlli di qualità da parte di un centro di riferimento Europeo che ne attesta la validità per le applicazioni suddette.

Informazioni generali

Sin dalla prima coltura di amniociti eseguita con successo negli anni '60, l'amniocentesi e la villocentesi si sono affermate come le tecniche più comunemente associate alla diagnostica prenatale.

Dalle cellule presenti nel liquido amniotico, rappresentative di una grande varietà di istotipi, si possono trarre utili indicazioni in merito allo status biochimico e citogenetico del feto. Queste cellule vengono pertanto utilizzate nella diagnostica clinica per l'analisi del DNA e per monitorare le eventuali anomalie cromosomiche o i difetti metabolici del feto.

Per procedere ad una diagnosi prenatale accurata, è necessario pertanto poter disporre di un sistema di coltura che consenta la crescita rapida di queste particolari cellule per poterne quindi studiare il cariotipo.

Le cellule provenienti da liquido amniotico o da villi coriali possono essere propagate sfruttando terreni convenzionali addizionati di siero bovino o avvalendosi di terreni con formulazione speciale.

Descrizione del prodotto

I terreni **Amniochrome** sono stati sviluppati per la diagnosi prenatale sfruttando la coltura *in vitro* di amniociti e da campioni di villi coriali, semplificando notevolmente la manualità richiesta agli operatori, pur mantenendo la massima affidabilità dei risultati. Tutte le formulazioni disponibili sono state ottimizzate verificandone le prestazioni e le capacità trofiche su amniociti e villi coriali; grazie ai fattori di crescita presenti e ai componenti che favoriscono

l'attecchimento cellulare, si riduce il tempo necessario per ottenere dei cloni indagabili e si incrementa il numero di colonie adese alla superficie di crescita.

Amniochrome™ Plus Medium

Il terreno **Amniochrome™ Plus** (02-026) viene fornito congelato e pronto all'uso, completo di antibiotici, L-Glutamina e FBS e naturalmente di tutti i fattori di crescita necessari. Questa formulazione viene tamponata con Sodio Bicarbonato ed addizionata di Rosso Fenolo. Si ottiene con ciò il risultato di ridurre sensibilmente la possibilità di eventuali contaminazioni dovute alle manipolazioni dei vari componenti in fase di preparazione del terreno completo. Questo terreno si è dimostrato inoltre particolarmente efficace nel favorire l'attecchimento cellulare e la successiva formazione di cloni e permette quindi di giungere all'analisi del cariotipo in tempi più brevi.

Amniochrome™ Plus è disponibile in flaconi da 100 e 500 ml

Amniochrome™ Pro Medium

Il terreno **Amniochrome™ Pro** (02-035) viene fornito congelato e pronto all'uso, completo di antibiotici, L-Glutamina e FBS e naturalmente di tutti i fattori di crescita necessari. Questa formulazione viene tamponata con Sodio Bicarbonato ed addizionata di Rosso Fenolo. Si ottiene con ciò il risultato di ridurre sensibilmente la possibilità di eventuali contaminazioni dovute alle manipolazioni dei vari componenti in fase di preparazione del terreno completo. Questo terreno si è dimostrato inoltre particolarmente efficace nel favorire l'attecchimento cellulare e la successiva formazione di cloni e permette quindi di giungere all'analisi del cariotipo in tempi più brevi.

Amniochrome™ Pro è disponibile in flaconi da 100 e 500 ml

Amniochrome™ II Modified Complete Medium System

L'**Amniochrome™ II Modified** si compone di un terreno liquido di base (cat. n. 12-756) disponibile in confezioni da 100 ml e 500 ml e da un supplemento congelato (cat. n. 17-524) di 7 e 35 ml rispettivamente. Il sistema completo è quindi formato da terreno base e supplemento forniti insieme ordinando il cod. 12-756EZM (100 ml) o 12-756FCM (500 ml).

La formulazione finale è completa di antibiotici, L-Glutamina e FBS e naturalmente di tutti i fattori di crescita necessari. Questa formulazione viene

tamponata con Sodio Bicarbonato, HEPES ed è addizionata di Rosso Fenolo.

Condizioni di conservazione e stabilità

Amniochrome™ Plus e Amniochrome™ Pro:

< -18°C, al riparo dalla luce

Amniochrome™ II Modified Complete Media

System: conservare il supplemento a < - 18°C, al riparo dalla luce; conservare il terreno di base a 2°C – 8°C al riparo dalla luce e fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.

Limitazioni: non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza.

Istruzioni d'uso

Preparazione dei terreni

Amniochrome™ Plus e Amniochrome™ Pro Medium – la preparazione del terreno richiede un bagnomaria o un incubatore a 30-37 °C. Per procedere allo scongelamento è consigliabile agitare delicatamente il flacone per facilitare il completo passaggio in soluzione di tutti i componenti. Se si usa un bagnomaria evitare di immergere la bottiglia fino al tappo. Va evitato comunque il surriscaldamento che potrebbe danneggiare alcune delle sostanze termolabili presenti nella composizione dei terreni.

Amniochrome™ II Modified – la preparazione del terreno prevede lo scongelamento del supplemento a 30-37 °C con bagnomaria o un incubatore.

Va evitato comunque il surriscaldamento che potrebbe danneggiare alcune delle sostanze termolabili presenti nella composizione dei terreni. Se si usa un bagnomaria evitare di immergere la bottiglia fino al tappo.

Una volta scongelato, aggiungere asetticamente l'intero contenuto del supplemento di

Amniochrome™ II modified al terreno di base: 7 ml nel terreno base da 100 ml e 35 ml nel terreno base da 500 ml. E' consigliabile agitare delicatamente il flacone per facilitare la completa miscelazione dei reagenti evitando la formazione di schiuma.

Il terreno **Amniochrome™** una volta ricostituito va conservato al riparo dalla luce a 2-8 °C, e utilizzato nell'arco di 2 settimane per poterne sfruttare appieno le capacità trofiche. Cicli ripetuti di congelamento/scongelamento, come pure la

prolungata esposizione alla luce dovrebbero essere in ogni caso evitati.

Il terreno **Amniochrome™** contiene Siero Fetale Bovino (FBS); pertanto, a seguito dello scongelamento e durante la conservazione, si potrà osservare la formazione di un sedimento flocculante.

Antibiotici

Il terreno **Amniochrome™** contiene Gentamicina, che ha effetti inibitori della crescita in misura inferiore rispetto alla Penicillina e alla Streptomina.

Test di funzionalità

Il terreno **Amniochrome™** viene sottoposto a controlli di sterilità in accordo alle indicazioni della Farmacopea Europea; viene inoltre misurato il pH e valutato il contenuto di endotossine. In aggiunta a queste analisi standard, un laboratorio di Citogenetica indipendente saggia la funzionalità di ogni lotto a fronte di un lotto di riferimento. Un Certificato di Analisi viene rilasciato a richiesta.

Precauzioni

Vi invitiamo a contattare il personale di Vendita e Marketing della sede Lonza per qualsiasi dubbio in merito al prodotto.

Non utilizzare il prodotto se:

- La confezione non è integra
- Il terreno appare torbido o in presenza di un precipitato visibile
- Il colore risulta diverso dal rosso – arancio tipico del Rosso Fenolo
-

Se il prodotto viene ricevuto scongelato o parzialmente scongelato, provvedere a riportarlo immediatamente a < -18°C e contattare il vostro ufficio Lonza di riferimento.

DA UTILIZZARE ESCLUSIVAMENTE NELL'AMBITO DI PROCEDURE DIAGNOSTICHE IN VITRO CHE RICHIEDONO LA COLTURA E LA CRESCITA DI CELLULE DA LIQUIDO AMNIOTICO UMANO E/O CAMPIONI DI VILLI CORIALI (CVS).

L'aggiunta di qualsivoglia supplemento al terreno Amniochrome™ è fortemente sconsigliata. I componenti aggiunti, anche solo per un effetto di diluizione, possono

compromettere la crescita cellulare o l'integrità dei cromosomi.

Limitazioni

Ogni laboratorio è tenuto a condurre una attenta valutazione delle proprie tecniche diagnostiche quando si introduce un nuovo terreno, prima di procedere all'adozione del nuovo terreno nella pratica routinaria in vitro. Il contributo Lonza a queste procedure si limita alla fornitura di un terreno di crescita, e di conseguenza Lonza non può garantire l'esito positivo del test per il solo fatto che sia stato impiegato un suo terreno.

Ciascun lotto di produzione è sottoposto a stringenti test di funzionalità su amniociti umani per assicurare la rispondenza del prodotto all'applicazione cui è destinato.

Tutti i terreni liquidi Lonza vengono preparati seguendo un processo asettico i cui vari passaggi sono stati individualmente validati al fine di garantire la rispondenza di ogni prodotto allo standard industriale di sterilità pari a 10^{-3} . Ciò significa che il prodotto deve dimostrare un livello di contaminazione mai superiore a 1 su 1000 unità nel corso dell'intero processo produttivo. Il livello più alto previsto dall'assicurazione di sterilità (uguale o superiore a 10^{-6}) può essere ottenuto solo ricorrendo alla sterilizzazione del prodotto finito, ma questo approccio ne danneggerebbe la performance in modo irrimediabile.

Protocollo di crescita

Il protocollo descritto è da intendersi come una guida alla coltura di amniociti umani e da campioni di villi coriali. Detto protocollo può sostituire in tutto o in parte quello già in uso presso il laboratorio, ottimizzato nel corso degli anni, a totale discrezione dell'utilizzatore. La maggior parte dei laboratori di Citogenetica ha messo a punto un proprio protocollo ed i terreni AmniochromeTM, nella maggioranza dei casi, possono essere integrati nel protocollo in uso senza particolari adattamenti.

I metodi colturali più diffusi prevedono l'utilizzo di un sistema "aperto".

Sistema "aperto" / Sistema "chiuso"

Definizione di sistema "aperto": si identifica con questo termine il ricorso ad una tecnica che contempla l'utilizzo di capsule Petri con coperchio ventilato e di flasks/provette con tappo allentato per permettere gli scambi gassosi in un incubatore al 5% di CO₂

Definizione di sistema "chiuso": si identifica con questo termine il ricorso ad una tecnica che contempla l'utilizzo di contenitori sigillati utilizzando un termostato a secco e in assenza di scambi gassosi

Raccomandazioni per l'utilizzo di un Sistema "aperto"

Metodo in situ

1. Concentrare le cellule contenute nel liquido amniotico centrifugando lo stesso a bassa velocità.
2. Rimuovere il 90-95% del sovrantante e risospendere il pellet cellulare nel liquido rimanente. Diluire la sospensione cellulare ottenuta con **AmniochromeTM Complete Medium** per permettere un volume finale di piastraggio di 0,5 ml per Petri (totale di 4 Petri) o di 2 ml per flask.
3. Riporre il tutto a 37°C in incubatore al 5% di CO₂
4. Aggiungere 2 ml di **AmniochromeTM Complete Medium** ad ogni coltura a partire dal secondo giorno
5. Controllare la crescita cellulare dopo 4-5 giorni. Aspirare con molta attenzione il sovrantante ed aggiungere 2 ml di terreno fresco. Si suggerisce di ripetere queste operazioni ogni due giorni.
6. Controllare la crescita cellulare dopo il quinto giorno e raccogliere un sufficiente numero di colonie per eseguire il test.
7. Per migliorare il risultato si suggerisce di aggiungere terreno fresco il giorno precedente alla raccolta delle colonie

Metodo in Flask

1. Concentrare le cellule contenute nel liquido amniotico centrifugando lo stesso a bassa velocità.
2. Rimuovere il 90-95% del sovrantante e risospendere il pellet cellulare nel liquido rimanente. Diluire la sospensione cellulare ottenuta con **AmniochromeTM Complete Medium** per permettere un volume finale di piastraggio di 0,5 ml per Petri (totale di 4 Petri) o di 2 ml per flask.
3. Riporre il tutto a 37°C in incubatore al 5% di CO₂.

4. Controllare la crescita cellulare dal quinto giorno. Sostituire il terreno di coltura .
5. Tenere sotto controllo la crescita cellulare e sostituire il terreno di coltura ogni giorno finchè non si ottiene un numero sufficiente di colonie per eseguire il test.
6. Per migliorare il risultato si suggerisce di aggiungere terreno fresco il giorno precedente alla raccolta delle colonie

Raccomandazioni per l'utilizzo di un Sistema "chiuso"

Il terreno **Amniochrome™** può essere utilizzato in un sistema "chiuso" finchè il pH rimane fisiologico (pH = 6,9 / 7,4). I sistemi chiusi hanno una intrinseca capacità tamponante anche in assenza dei vantaggi forniti dall'equilibrio del terreno addizionato con Bicarbonato e dalla presenza di un atmosfera controllata al 5% di CO₂.

I sistemi chiusi ben si adattano ad applicazioni di clonaggio con bassa densità cellulare mentre viceversa la produzione troppo alta di metaboliti acidi può creare problemi alle colture. Il controllo del pH in un sistema chiuso può essere ottenuto utilizzando uno dei tre differenti metodi suggeriti:

- Metodo 1: Aggiungere al terreno **Amniochrome™ Plus** o **Amniochrome™ Pro** una soluzione sterile al 2% di HEPES 1,0 M. Controllare il pH ed eventualmente correggerlo utilizzando una soluzione di NaOH 1,0 M a 20 °C in modo da ottenere un valore finale pH = 7. Il terreno così preparato verrà aggiunto alle cellule ed incubato a 37°C in un sistema chiuso.
- Metodo 2: Pre-equilibrare il terreno **Amniochrome™ Plus** o **Amniochrome™ Pro** in un incubatore al 5% di CO₂ utilizzando flask con cellule per almeno un'ora e procedere poi con la coltura a 37°C.
- Metodo 3: Utilizzando una pipetta Pasteur sterile far passare per almeno 20 secondi un flusso di CO₂ all'interno della coltura in flask.. Richiudere il tappo e continuare la coltura nel termostato.
- **Amniochrome II Modified Complete Medium** può essere utilizzato direttamente in un sistema chiuso in quanto supplementato di HEPES per garantire un controllo accurato del pH.

BIBLIOGRAFIA

1. Knutsen, T., (1990) International Cytogenetic Laboratory Directory, Association of Cytogenetic Technologists, ed.
2. Priest, R.E., Marimuthu, K.M., Priest J.H. (1978) Origin of human amniotic fluid cultures. *Lab. Invest.* **39**, 106.
3. Bobrow, M., Evans, C.J., Noble, J., and Patel, C. (1978) Cellular content of amniotic fluid as predictor of central nervous system malformations. *J. Med. Gen.* **15**, 97.
4. Hirota, T., Kondoh, T., Matsumoto, T., Jinno, Y., Niikawa, N. (1989) Microextraction of DNA from whole blood and amniocytes. *Jpn. J. Human Genet.* **34**, 217.
5. Henry, G.P., Peakman, D.C., Robinson, A. (1978) Prenatal genetic diagnosis: Nine years experience. *Obstet. Gynecol. Survey* **33**, 569.
6. -Hecht, F., Peakman, D.C., Kaiser-McCaw, B., Robinson, A. (1981) Amniocyte clones for prenatal cytogenetics. *Amer. J. Med. Genet.* **10**, 51.
7. Rosenblatt, D.S., Hosack, A. and Matiaszuk, N. (1987) Expression of transcobalamin II by amniocytes. *Prenatal Diagnosis* **7**, 35.
8. Moser, H.W., Moser, A.B., Powers J.M. et al. (1982) The prenatal diagnosis of increased hexacosanoic acid levels in cultured amniocytes and fetal adrenal gland. *Ped. Res.* **16**, 172.
9. Brown B. I., Brown D.H. Branching (1989) enzyme activity of cultured amniocytes and chorionic villi: testing for type IV glycogen storage disease. *Amer. J. Hum. Genet.* **44**, 378.
10. Renlund, M., and Aula P. (1987) Prenatal detection of Salla disease based upon Increased free sialic acid in amniocytes. *Amer. J. Hum. Genet.* **28**, 377.
11. Epstein, C.J. (1982) The use of growth factors to stimulate the proliferation of amniotic fluid cells. *Methods in Cell Biology* **26**, 269.
12. Chang, H., Jones, O.W. (1982) Human amniotic fluid cells grown in a hormone-supplemented medium: Suitability for prenatal diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4795.
13. Biddle, W.C., Kuligowski, S., Filby, J., Custer-Hagen, T. and Lockwood, D.H. (1992) AmnioGrow Medium-C100: A new specialized cell culture medium for the propagation of human amniocytes. *Focus* **14**, 3.

Amniochrome™ è un marchio registrato di CBM Intellectual Properties Inc.

Per ulteriori informazioni su questi o altri prodotti Lonza contattare il Servizio Tecnico al seguente riferimento telefonico: 0363 351470, oppure per E-Mail: techsup.europe@Lonza.com

Se necessario vi invitiamo inoltre a contattare il nostro personale di Vendita o a consultare il nostro sito Web: www.lonza.com

Per uso Diagnostico In Vitro

ATTENZIONE: non utilizzare per uso terapeutico umano o animale. Utilizzi diversi da quelli riportati possono costituire una violazione delle leggi locali.

PRODUTTORE
Lonza Verviers S.p.r.l.
Parc Industriel de Petit Rechain
B-4800 Verviers
Belgium

Di seguito una tabella riassuntiva con i simboli e le loro definizioni:

| Symbol | Signification |
|---|---|
|  | Numero di catalogo |
|  | Codice del lotto |
|  | Utilizzare entro AAAA-MM |
|  | Limite superiore di temperatura |
|  | Limitazioni di temperatura |
|  | Dispositivo medico diagnostico <i>In Vitro</i> |
|  | Sterilizzato usando un processo asettico |
|  | Produttore |
|  | Numero di serie |