

## Amniochrome™ Media

---

### *Information sur les produits*

<b>Amniochrome™ Plus</b>	02-026E	100 ml
	02-026F	500 ml

<b>Amniochrome™ Pro</b>	02-035E	100 ml
	02-035F	500 ml

#### **Milieu complet Amniochrome™ II modifié**

12-756EZM	100 ml
(Equivalent à : 12-756E+17-524ZM)	

12-756FCM	500 ml
(Equivalent à : 12-756F+17-524CM)	

## **ATTENTION**

Manipuler selon des pratiques “bio-safety” établies.

## Résumé des caractéristiques des produits

### Application

Les milieux **Amniochrome™** sont destinés à un usage *In Vitro Diagnostic* et ont été conçus pour réaliser des cultures primaires de cellules de fluide amniotique humain (AFC) et de prélèvement de villosités chorioniques (CVS), qui peuvent ensuite subir un caryotype, une hybridation in-situ par fluorescence (FISH) ou d'autres procédures cytogénétiques. Ces produits ont donc été soumis à des contrôles qualité rigoureux faits par un laboratoire de référence européenne pour ces applications cytogénétiques.

### Historique

Depuis la première culture réussie de cellules AFC dans les années soixante, les prélèvements d'amniocytes et de villosités chorioniques sont devenus les tests les plus répandus pour le diagnostic prénatal.

Les AFC, qui représentent une variété d'histotypes<sup>1-3</sup>, reflètent l'état du fœtus au point de vue de la composition biochimique et cytogénétique. Ces cellules peuvent donc être utilisées en diagnostic clinique pour une analyse ADN<sup>4</sup> et pour mettre en évidence des anomalies chromosomiques<sup>5-6</sup> ou des déficiences dans les enzymes métaboliques<sup>7-10</sup> du fœtus.

Pour un diagnostic prénatal efficace, il est nécessaire d'avoir une culture ex-vivo et un caryotype rapides de ces AFC. Les AFC et les CVS peuvent être mises en culture soit dans un milieu de culture classique supplémenté avec du sérum bovin ou dans un milieu de culture spécialisé<sup>11-13</sup>.

### Description

Les milieux **Amniochrome™** ont été spécifiquement développés pour un diagnostic prénatal in vitro des prélèvements du fluide amniotique et des villosités chorioniques simple et efficace. Chaque formulation a été optimisée via des tests de performance très poussés sur des prélèvements de fluide amniotique et de villosités chorioniques. L'ajout de facteurs favorisant l'attachement et la croissance permet de diminuer

le temps nécessaire au diagnostic en accélérant l'attachement et la croissance des cellules.

Tous les lots produits sont testés de la même manière par rapport à des standards pour assurer leur performance clinique optimale.

## Amniochrome™ Plus Medium

Le milieu Amniochrome™ Plus (02-026) est fourni congelé, prêt à l'emploi et contient déjà des antibiotiques, de la L-glutamine, du FBS, des hormones et des facteurs de croissance pour la facilité de l'utilisateur.

Amniochrome™ Plus est tamponné par du bicarbonate de sodium et contient du rouge phénol comme indicateur de pH. Cette formulation donne un milieu prêt à l'emploi qui diminue le risque d'erreur technique et de contamination. En outre, ce milieu favorise un meilleur attachement et une meilleure croissance cellulaire, permettant une analyse chromosomique plus rapide. Amniochrome™ Plus est disponible en conditionnement de 100 ml ou de 500 ml.

## Amniochrome™ Pro Medium

Le milieu Amniochrome™ Pro (02-035) est fourni congelé, prêt à l'emploi et contient déjà des antibiotiques, de la L-glutamine, du FBS, des hormones et des facteurs de croissance pour la facilité de l'utilisateur.

Amniochrome™ Pro est tamponné par du bicarbonate de sodium et contient du rouge phénol comme indicateur de pH. Cette formulation donne un milieu prêt à l'emploi qui diminue le risque d'erreur technique et de contamination. En outre, ce milieu favorise un meilleur attachement et une meilleure croissance cellulaire, permettant une analyse chromosomique plus rapide. Amniochrome™ Pro est disponible en conditionnement de 100 ml ou de 500 ml.

### Milieu complet Amniochrome™ II modifié

Le milieu Amniochrome™ II est constitué d'un milieu de base réfrigéré (cat.no. 12-756), disponible soit par 100 ml, soit par 500 ml, et d'un supplément congelé (cat. no. 17-524), disponible soit par 7 ml, soit par 35 ml. Le milieu complet (milieu de base + supplément) est fourni sous la forme 12-756EZM (100 ml) ou 12-756FCM (500 ml)

Le milieu complet final contient déjà des antibiotiques, de la L-glutamine, du FBS, des

hormones et des facteurs de croissance pour la facilité de l'utilisateur.

Amniochrome II modifié est tamponné par du bicarbonate de sodium et de l'hépes. Il contient du rouge phénol comme indicateur de pH.

## **Conservation et péremption**

### **Amniochrome™ Plus et Amniochrome™ Pro**

Conserver à < - 18° C et à l'abri de la lumière jusqu'à la date d'expiration.

### **Milieu complet Amniochrome™ II modifié**

Conserver le supplément à < - 18° C à l'abri de la lumière jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette. Conserver le milieu de base de 2° à 8° C à l'abri de la lumière jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette.

**Restriction:** Ne pas utiliser au-delà de la date d'expiration.

## **Mode d'emploi**

### **Preparation du milieu**

Les milieux **Amniochrome™ Plus et Amniochrome™ Pro** – doivent être décongelés dans un bain-marie ou incubateur entre 30 et 37° C. Une température trop élevée dégraderait des composants sensibles à la chaleur. En cas d'utilisation d'un bain-marie, éviter que le niveau de l'eau n'atteigne le bouchon des bouteilles. Remuer doucement les bouteilles jusqu'à décongélation complète. Une agitation périodique adéquate est nécessaire pour empêcher l'apparition de cryoprécipités.

**Amniochrome™ II modifié** – Décongeler complètement le supplément dans un bain-marie ou incubateur entre 30 et 37° C. Une température trop élevée dégraderait des composants sensibles à la chaleur. En cas d'utilisation d'un bain-marie, éviter que le niveau de l'eau n'atteigne le bouchon des bouteilles. Remuer doucement les bouteilles jusqu'à décongélation complète. Une agitation périodique adéquate est nécessaire pour empêcher l'apparition de cryoprécipités.

Ajouter aseptiquement tout le contenu du supplément d'Amniochrome™ II modifié à une bouteille de milieu de base d'Amniochrome™ II modifié, c'est-à-dire 7 ml de supplément à 100 ml de milieu de base ou 35 ml de supplément à 500 ml de milieu de base.

Remuer doucement le milieu complet ainsi obtenu pour obtenir un mélange total. Eviter la formation de mousse.

Les milieux **Amniochrome™** doivent être stockés une fois ouverts dans le noir entre 2 et 8 ° C et utilisés dans les 15 jours pour assurer des performances optimales. Des cycles répétés de réchauffement – refroidissement et des expositions prolongées à la lumière doivent être évités.

Les milieux **Amniochrome™** contiennent du sérum bovin. Des débris floculants peuvent dès lors apparaître lors de la décongélation et le stockage.

## **Antibiotiques**

Les milieux **Amniochrome™** contiennent de la gentamycine, qui a un effet inhibiteur moins prononcé sur la croissance cellulaire que la pénicilline et la streptomycine.

## **Evaluation de la performance**

Les milieux **Amniochrome™** sont testés pour la stérilité selon la pharmacopée européenne, et pour le pH et la teneur en endotoxines. En plus de ces tests standards, chaque lot produit est testé pour sa capacité à assurer la croissance cellulaire dans un laboratoire de cytogénétique européen indépendant, qui le compare à une référence standard. Un certificat d'analyse (CoA) est disponible sur demande.

## **Précautions**

Contactez directement le département "Sales et Marketing" de Lonza Verviers pour toute question relative à ces produits ou demander à votre distributeur local de le faire en votre nom.

### Ne pas utiliser le produit si :

- L'emballage paraît abîmé.
- Les produits sont troubles ou montrent un précipité.
- La couleur n'est pas rouge-orange.

Si le produit est livré partiellement ou complètement décongelé, le congeler immédiatement à  $-18^{\circ}\text{C}$  et contacter Lonza Verviers.

UTILISER UNIQUEMENT DANS DES PROCÉDURES *IN VITRO DIAGNOSTIC* NECESSITANT LA CULTURE ET LA CROISSANCE DE CELLULES DU FLUIDE AMNIOTIQUE (AFC) ET/OU DE PRELEVEMENT DE VILLOSITES CHORIONIQUES (CVS).

**D'autres ajouts aux milieux Amniochrome™ ne sont pas recommandés. Ajouter des composants ou diluer le milieu peut donner des effets négatifs sur la croissance cellulaire ou sur l'intégrité des chromosomes.**

## Restrictions

Chaque laboratoire doit développer ses propres procédures de test sur tout nouveau lot avant de le libérer pour un usage *in vitro* en routine. La contribution de Lonza Verviers à ces procédures est de fournir un milieu de culture ou de maintien. Lonza Verviers ne peut donc garantir la réussite de quelque test que ce soit basé uniquement sur l'utilisation de ses produits.

Chaque nouveau lot d'Amniochrome™ produit est testé en profondeur sur des isolats de fluide amniotique pour vérifier ses performances en diagnostic *in vitro* pour cette application.

Les milieux liquides pour la culture cellulaire de Lonza Verviers sont préparés selon un processus aseptique dont chaque étape a été validée pour que nos produits rencontrent le niveau standard d'assurance de stérilité de l'industrie ( $10^{-3}$ ). Ces produits ne dépassent donc pas un taux de contamination de 1 à 1000 unités durant le processus de fabrication. Le plus haut niveau d'assurance stérilité ( $\geq 10^{-6}$ ) ne peut être atteint sans stérilisation finale, ce qui altérerait les performances des produits destinés à la culture cellulaire.

## Protocoles de culture cellulaire

Les protocoles ci-dessous sont des guides pour la culture des AFC et CVS au moyen des milieux Amniochrome™. Ils peuvent cependant être utilisés pour remplacer tout ou partie de protocoles existants pour ces lignées, à la discrétion de

l'utilisateur. La plupart des laboratoires de cytogénétiques ont leurs propres protocoles et les milieux Amniochrome™ peuvent dans la majorité des cas être inclus dans les protocoles existants.

La méthode la plus courante de culture utilise un système « ouvert ».

## Système ouvert / Système fermé

**Définition du système ouvert:** Cultures en croissance en boîtes de Pétri avec couvercle ventilé ou en T-flasks ou tubes dont le bouchon est entrouvert dans une atmosphère à 5% de  $\text{CO}_2$ , qui permet les échanges gazeux.

**Définition du système fermé :** Cultures en croissance dans un incubateur sec, sans  $\text{CO}_2$ , dans des flacons dont le bouchon est hermétiquement fermé.

## Recommandations d'utilisation en système « ouvert »

### Méthode *in situ*

1. Concentrer les cellules par centrifugation à basse vitesse du liquide amniotique.
2. Eliminer 90-95 % du surnageant et resuspendre le culot cellulaire dans le volume restant de liquide amniotique du patient. Diluer la suspension concentrée avec suffisamment de milieu Amniochrome™ complet pour obtenir un volume d'ensemencement de 0.5 ml par coverslip (4 coverslips au total) ou de 2 ml par flaskette.
3. Incuber les cellules à  $37^{\circ}\text{C}$  dans une atmosphère à 5% de  $\text{CO}_2$ .
4. Ajouter 2 ml d'Amniochrome™ complet à chaque culture le jour 2.
5. Vérifier la croissance des cellules après 4 à 5 jours. Entretenir les cultures lorsqu'une croissance a été observée. Pour ce faire, aspirer doucement le milieu appauvri et le remplacer par 2 ml du milieu complet frais. Il est recommandé de remplacer le milieu tous les 2 jours.
6. Au jour 5 ou après, récolter les cellules si un nombre suffisant de colonies sont observées.

7. Pour un meilleur résultat, entretenir les cellules avec l'Amniochrome™ complet le jour précédent la récolte.

## Méthode en flacon

1. Concentrer les cellules par centrifugation à basse vitesse du liquide amniotique.
2. Eliminer 90-95 % du surnageant et resuspendre le culot cellulaire dans le volume restant de liquide amniotique. Diluer la suspension concentrée avec suffisamment de milieu Amniochrome™ complet pour obtenir un volume d'ensemencement de 0.5 ml par coverslip (4 coverslips au total) ou de 2 ml par flaskette.
3. Incuber les cellules à 37° C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>
4. Au jour 5, vérifier la croissance obtenue. Eliminer le milieu et le remplacer par du milieu frais. Récolter si les cellules si un nombre suffisant est atteint.
5. Sinon, vérifier la croissance cellulaire et changer le milieu tous les jours jusqu'à ce qu'un nombre suffisant de colonies soit atteint pour la récolte
6. Pour un meilleur résultat, entretenir les cellules avec l'Amniochrome™ complet le jour précédent la récolte.

- Méthode 1: Supplémenter le milieu **Amniochrome™ Plus** ou **Amniochrome™ Pro** avec 2% (v/v) de solution stock de HEPES 1 M. La solution stérile de HEPES 1M doit être ajusté à pH 7.0 à 20°C avec du NaOH 1M. Le milieu ainsi supplémenté en HEPES est ensuite combiné aux cellules et incubé à 37°C avec le bouchon du flacon fermé
- Méthode 2: Pré-équilibrer les flacons de culture entrouverts contenant du milieu **Amniochrome™ Plus** ou **Amniochrome™ Pro** et les cellules dans un incubateur ouvert avec 5% en CO<sub>2</sub> pendant 1 heure, puis fermer les bouchons et mettre les cultures à 37°C.
- Méthode 3: Faire buller dans chacun des flacons de culture contenant du milieu **Amniochrome™ Plus** ou **Amniochrome™ Pro** et les cellules un mélange 5% CO<sub>2</sub> - 95% air au moyen d'une pipette stérile pendant 20 secondes. Fermer ensuite le bouchon et mettre en culture dans un système fermé à 37°C. Il est recommandé de connecter une pipette Pasteur stérile à la source de CO<sub>2</sub> pour assurer sa stérilité
- Le milieu complet **Amniochrome II** peut être utilisé directement en système fermé, car il contient déjà de l'HEPES pour maintenir un pH correct.

## Recommandations d'utilisation en système fermé

Les milieux **Amniochrome™** peuvent être utilisés pour des cultures en système fermé aussi longtemps que le pH reste physiologique (entre 6.9 et 7.4). Le système fermé est basé sur la capacité tampon intrinsèque du milieu en l'absence de l'équilibre provenant de l'interaction entre le bicarbonate de sodium contenu dans le milieu et le CO<sub>2</sub> de l'incubateur. Ce système fermé fonctionne le mieux pour des applications de clonage à faible densité cellulaire. En effet, des cellules à plus hautes densités produisent des métabolites acides qui vont acidifier le milieu et amener le pH en dehors de valeurs physiologiques. Le maintien du pH peut être réalisé par une des 3 méthodes décrites ci-dessous :

## REFERENCES

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.

## Pour commander

Cat.No. Volume

---

### Amniochrome™ Plus

Milieu complet prêt à l'emploi pour les cultures primaires de cellules du fluide amniotique et des villosités chorioniques utilisées en cytogénétique.

*A usage In Vitro Diagnostic.*

**Conservation :** < - 18° C

02-026E	100 ml
02-026F	500 ml

### Amniochrome™ Pro

Milieu complet prêt à l'emploi pour les cultures primaires de cellules du fluide amniotique et des villosités chorioniques utilisées en cytogénétique.

Optimisé pour le taux de croissance. *A usage In Vitro Diagnostic.*

**Conservation :** < - 18° C

02-035E	100 ml
02-035F	500 ml

### Milieu complet Amniochrome™ II modifié

Milieu complet prêt à l'emploi pour les cultures primaires de cellules du fluide amniotique et des villosités chorioniques utilisées en cytogénétique.

*A usage In Vitro Diagnostic.*

**Conservation :** < - 18° C (7 ml ou 35 ml supplement)

2°C – 8°C (100 ml ou 500 ml basal)

#### 12-756EZM Milieu complet Amniochrome™ II modifié (107 ml)

Equivalent à :

12-756 <sup>E</sup>	Amniochrome™ II Basal Medium	100 ml
17-524ZM	Amniochrome™ II Supplement Modified	7 ml

#### 12-756FCM Milieu complet Amniochrome™ II modifié (535 ml)

Equivalent à:

12-756F	Amniochrome™ II Basal Medium	500 ml
17-524CM	Amniochrome™ II Supplement Modified	35 ml

Amniochrome™ is a trademark of CBM Intellectual Properties Inc.

Pour de plus amples informations sur ces produits ou tout autre produit de Lonza Verviers, contacter le service technique au numéro suivant : +32 87 32 16 11

E-Mail: [techsup.europe@lonza.com](mailto:techsup.europe@lonza.com)

Vous pouvez aussi contacter votre représentant Lonza Verviers ou notre site Web à : [www.lonza.com](http://www.lonza.com)

## A usage *In Vitro* Diagnostic

**ATTENTION : Ces produits ne sont pas à usage thérapeutique humain ou animal. Utiliser ces produits à d'autres usages que ceux mentionnés sur l'étiquette peut être en contradiction avec la législation locale.**

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

Le tableau suivant montre les symboles et leur signification:

Symbol	Signification
	Numéro de référence
	Numéro de lot
	Date de Péréemption AAAA-MM
	Limite supérieure de température
	Intervalle de température de conservation
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Stérile, préparé aseptiquement
	Fabricant
	Numéro de série