

Meio AmnioGrow Plus

Informações do Produto

Catalog No. AGM – 100M (100 ml frozen)
AGM – 500M (500 ml frozen)

Meio AmnioGrow Plus

INFORMAÇÕES DO PRODUTO

CUIDADO

Manusear de acordo com as práticas de biossegurança estabelecidas.

RESUMO CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO

INDICAÇÃO

O meio **AmnioGrow Plus** é destinado para uso em procedimentos de diagnóstico in vitro e foi projetado para estabilizar culturas primárias de células de fluido amniótico humano (AFC) e amostras vilo-corial, que podem então ser utilizado em cariótipo, hibridização fluorescente in-situ (FISH) e outros procedimentos citogenéticos. O produto foi testado rigorosamente no controle de qualidade de um laboratório líder europeu no diagnóstico citogenético para esta aplicação.

JUSTIFICATIVA

O diagnóstico pré-natal requer e é dependente de diferentes técnicas invasivas e não invasivas para investigar gestação fetal e detectar possíveis disfunções e anormalidades fetais. A amniocentese e amostras de biópsia da vilosidade corial (CVS) representam a maior parte dos procedimentos invasivos usados para diagnóstico clínico e são métodos comuns na rotina para investigar anormalidades no feto, defeitos de enzimas metabólicas e para análise do DNA.

Desde que a cultura de células de fluido amniótico foi introduzida nos procedimentos citogenéticos a citogenética e características bioquímicas de cada célula mostraram-se uma ferramenta adequada para analisar o status fetal e portanto este procedimento poderia

estabelecer propostas para diagnóstico pré-natal. A tecnologia é baseada no cultivo e cariotipagem de células do fluido amniótico no qual representam diferentes histotipos. Estas células tem sido tradicionalmente cultivadas meios de cultura suplementados com soro fetal bovino.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

AmnioGrow Plus foi desenvolvido especificamente para teste diagnóstico pré-natal in vitro de fluido amniótico humano e espécimes CVS e projetado para facilitar o manuseio. Cada formulação foi otimizada por meio de testes de desempenho em fluido amniótico primário e amostras de biopsia de vilosidades coriônicas com substâncias promotoras de crescimento e de ligação, para minimizar o tempo de preparo por maximizar o crescimento e fixação das colônias. Cada lote de produto fabricado, é testado com padrões rigorosos para garantir um desempenho clínico necessário.

AmnioGrow Plus é fornecido pronto para uso e já contém antibióticos, L-Glutamina e FBS, hormônio e fatores de crescimento oferecendo maior comodidade para o usuário final.

AmnioGrow Plus é tamponado com bicarbonato de sódio e o fenol red está presente como indicador de pH. A formulação completa reduz a chance de erro técnico e contaminação da cultura. Além disso, este produto suporta a ligação de células e crescimento celular mais eficiente, resultando em uma análise cromossômica precoce.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TEMPO DE VIDA

Freezer: Armazenar a -20°C e no escuro até o prazo de validade indicado no rótulo.

Refrigerador: Armazenar entre 2 a 8°C por até 2 semanas.

Limitação: Não use após a data de validade.

INSTRUÇÕES PARA USO

AmnioGrow Plus é um meio que já está pronto para ser utilizado após o descongelamento em banho-maria 37°C ou na geladeira agitando suavemente para assegurar um líquido homogêneo.

Após aberto, manter no escuro na geladeira (2 e 8°C) e utilizar dentro de 2 semanas para seu bom desempenho.

Após descongelar, evitar a exposição prolongada a luz e o aquecimento repetido do meio. Evitando assim os grumos decorrentes do soro fetal bovino (SFB).

AmnioGrow Plus é um meio completo, fornecido em formato congelado e estéril. A refiltração do meio não é necessária.

DESCONGELAMENTO

AmnioGrow Plus Medium deve ser descongelado em banho maria a 37°C e misturado por agitação antes de usar. Uma alternativa é descongelar em uma incubadora a 37°C CO₂ com a tampa entre aberta para normalização automática do pH. AmnioGrow Plus Medium também pode ser descongelado overnight a 4°C. Aquecer o meio em pH adequado é melhor para a inicialização das culturas.

CONTROLE DO PH

O Amniogrow é um meio fornecido no pH 6,9 a 7,1, mas ocasionalmente pode variar.

Contém fenol red como um indicador de pH:

- A cor rosa indica um pH elevado (muito alcalino) podendo ser corrigido através de uma pequena abertura na tampa e incubando com 5% de CO₂ durante 1h.
- A cor amarela indica um pH baixo (ácido~pH 6,7), podendo ser corrigido da mesma forma acima.
- A cor pode ser comparada a uma garrafa fresca descongelada, se necessário.

ANTIBIÓTICOS

O meio apresenta 50ug/ml de gentamicina, que é menos agressivo que é menos inibitória para o crescimento comparado com Penincilina e Streptomicina.

ESTABILIDADE

- **AmnioGrow Plus** permanece estável até a data de validade contida na etiqueta quando congelado.
- Não usar após a data de validade contida na etiqueta.
- AmnioGrow Plus Medium pode ser usado por até 2 semanas descongelado e armazenado a 4°C, mas eventualmente a glutamina vai degradar. Pode ser suplementado apenas uma vez com L-glutamina até 2.0mM (Volume de 1/100 de 200mM glutamina armazenada).
- Aquecimento e resfriamento repetido e exposição a luz deve ser evitado.

TESTE DE PERFORMANCE

O meio **AmnioGrow Plus** é testado quanto a esterilidade e analisados quanto ao pH e osmolaridade. Em adição a estas especificações padrão, cada lote fabricado é testado para o crescimento celular por um laboratório de Citogenética independente e o desempenho do produto é comparado a uma referência padrão. Um Certificado de Análise (CoA) está disponível mediante solicitação.

PRECAUÇÕES

Por favor, contactar diretamente o Departamento de Vendas e Marketing da Cytogen para quaisquer preocupações relativas ao produto ou pergunte ao seu distribuidor local para fazê-lo em seu nome.

Não use o produto se:

- A embalagem parecer comprometida.

- O produto parecer turvo ou um precipitado visível for observado.
- A cor não for um vermelho-alaranjado.

Se o produto é recebido descongelado ou parcialmente descongelado, colocar imediatamente no freezer -20° e contactar a Cytogen.

PARA USO EM PROCEDIMENTOS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO REQUER APENAS O CULTIVO E CRESCIMENTO DE CÉLULAS DE FLUIDO AMNIOTICO HUMANO E/OU AMOSTRAS DE BIOPSIA DE VILOSIDADE CORIONICA (CVS).

A SUPLEMENTAÇÃO ADICIONAL AO **MEIO AMNIOGROW PLUS NÃO É RECOMENDADA.**

LIMITAÇÕES

Cada laboratório deve realizar seus próprios procedimentos de validação dos meios antes de liberá-los para rotina de aplicações in vitro. A contribuição da Cytogen para estes procedimentos é simplesmente proporcionar um meio de cultura e portanto a CytoGen não garante resultado positivo de qualquer teste baseado apenas no uso de meio Cytogen.

Cada lote de meio AMNIOGROW PLUS fabricado, tem o seu desempenho testado em isolados de fluido amniótico primário para garantir o desempenho do produto para uso no diagnóstico in vitro.

- CADA MÉDICO/CIENTISTA DEVE FAZER UM JULGAMENTO INDEPENDENTE SOBRE SE ESTE MEIO É ADEQUADO PARA USO EM APLICAÇÕES DE DIAGNÓSTICO IN VITRO CONDUZIDO EM SEU LABORATÓRIO.
- CYTOGEN GmbH NÃO GARANTE SUCESSO DE QUALQUER DIAGNÓSTICO BASEADO UNICAMENTE NA MARCA DA CYTOGEN.
- A CONTRIBUIÇÃO DA CYTOGEN PARA ESTES PROCEDIMENTOS É SIMPLEMENTE UMA ETAPA DA CULTURA CELULAR OU MANIPULAÇÃO DO MEIO PARA ESTES PROCEDIMENTOS.

Os produtos Cytogen para cultura líquida de células são preparados por um processo de assepsia no qual cada etapa foi validada para garantir que todos os atendam o nível de garantia de esterilidade padrão da indústria de 10^{-3} ; ou seja, os produtos que demonstram nível de contaminação não mais que 1 de 1000 unidades durante o processo de fabricação. O alto nível de segurança de garantia de esterilidade (igual ou maior a 10^{-6}) não podem ser atingidos sem esterilização terminal, que é prejudicial para o desempenho de tais produtos de cultura de células.

PROTOCOLOS DE CULTURA CELULAR

Os protocolos abaixo fornecem um guia para cultura AFC e CVS usando o meio **AmnioGrow Plus**. Eles podem ser usados para substituir qualquer parte ou a totalidade dos protocolos existentes para otimizados existentes para cultura AFC e CVS, a critério do usuário. A maioria dos laboratórios de citogenética tem seu próprio protocolo e o meio AmnioGrow Plus pode, na maioria dos casos, ser simplesmente substituído no atual protocolos de cultura celular. O método de cultura mais comum é um sistema “aberto”.

SISTEMA ABERTO/SISTEMA FECHADO

Definição de sistema "aberto": culturas crescendo em pratos com tampas ventiladas ou em frascos / tubos com tampas soltas em uma atmosfera de CO₂ a 5% (incubadora de gás) que permite a troca de gases.

Definição do sistema "fechado": as culturas crescem numa incubadora padrão, seco em recipientes de cultura hermeticamente fechado.

RECOMENDAÇÕES PARA USO DE SISTEMA ABERTO

Método in situ

1. Concentrar as células por centrifugação do líquido amniótico, a baixa velocidade.
2. Retirar 90-95% do sobrenadante e ressuspender o pellet celular no restante do volume de líquido amniótico próprio do paciente. Dilui-se a suspensão de células com concentrado suficiente de meio AmnioGrow Plus para permitir o volume de chapeamento final de 0,5 ml por placa (total de 4 placas) ou 2 ml por garrafa.
3. Incubar as culturas a 37 ° C numa atmosfera de 5% de CO₂.
4. Adicionar 2 ml de AmnioGrow para cada cultura no dia 2.
5. Verifique culturas de crescimento depois de 4 a 5 dias. Alimente culturas uma vez que o crescimento tenha sido observado. Para alimentar as culturas, aspirar cuidadosamente todos os meios de cultura substituir com 2ml de AmnioGrow. Culturas de alimentação: Recomendação a cada 2 dias.
6. Verifique culturas para o crescimento em / ou após o dia 5, e da colheita, quando as colônias são observadas.
7. Para melhores resultados, alimentar culturas com AmnioGrow um dia antes da colheita.

Método do Frasco:

1. Concentrar as células por centrifugação do líquido amniótico, a baixa velocidade.
2. Remover 90-95% do sobrenadante e ressuspender o pellet celular no restante volume de líquido amniótico próprio do paciente. Dilui-se a suspensão de células com concentrado suficiente de AmnioGrow Plus para permitir volume de chapeamento final de 0,5 ml por placa (total de 4 placas) ou 2 ml por garrafa.
3. Incubar as culturas a 37 ° C numa atmosfera de 5% de CO₂.
4. No dia 5 de seleção para crescimento. Remova o meio e substitua por AmnioGrow fresco e veja se o crescimento de células é observado.
5. Verifique a cultura para o crescimento e mude completamente o meio a cada dois dias, depois

olhar para saber se as colônias são suficientes para a colheita.

6. Para melhores resultados, alimentar culturas com AmnioGrow um dia antes da colheita.

RECOMENDAÇÃO PARA USO DE SISTEMA FECHADO

O meio AmnioGrow pode ser utilizado para cultura de células em um sistema "fechado", desde que o pH permaneça fisiológico (pH = 6,9-7,4). Os sistemas fechados precisam ter a capacidade intrínseca de tamponamento do meio na ausência do benefício proporcionado pelo equilíbrio entre o bicarbonato e o meio a 5% de CO₂ presente em uma incubadora de sistema aberto. Os sistemas fechados funcionam melhor na clonagem de aplicações com baixa densidade celular, uma vez mais altas, as densidades celulares produzem metabólitos ácidos que pode acidificar o meio. Manutenção do pH pode ser realizado num sistema fechado por um dos três métodos seguintes:

- Método 1: Suplemento AmnioGrow Além Médio com 2% (v / v) de solução estéril de 1,0 M de HEPES solução estoque. Os HEPES 1,0 M esterilizados devem ser ajustadas para um pH de 7,0 a 20 ° C com 1,0 M NaOH. Os meio HEPES suplementado é então combinado com as células e incubados a 37 ° C, com o frasco de cultura fechada.
- Método 2: frascos de cultura pré-equilibrados contendo AmnioGrow e células em com sistema aberto de 5% incubadora de CO₂ por uma hora antes de fechar a tampa e cultura em 37 ° C.
- Método 3: Pingar em cada frasco de cultura o meio AmnioGrow em células com 5% de CO₂ - 95% de ar a partir de uma pipeta esterilizada, durante 20 segundos. Em seguida, feche a tampa de cultura num sistema fechado, a 37 ° C. (Recomenda-se que uma pipeta Pasteur estéril seja ligado à fonte de CO₂ para assegurar a esterilidade do gás de entrada).

REFERÊNCIAS

- A)** Bartalini, G., Margollicci, M.A., Balestri, P., and Fois, A. Evaluation of lysosomal enzymes in uncultured and cultured chorionic villi and amniocytes. *J. Inher. Metab. Dis.* 11, Suppl. 2, 263 (1988).
- B)** Chang, H., Jones, O.W. Human amniotic fluid cells grown in a hormone-supplemented medium: Suitability for prenatal diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4795 (1982).
- C)** Epstein, C.J. The use of growth factors to stimulate the proliferation of amniotic fluid cells. *Methods in Cell Biology* 26, 269 (1982).
- D)** Gravel, R.A., Leung, A., Tsui, F., Koldny, H. A micromethod for the detection of arylsulfatases A and B in cultured fibroblasts and amniocytes. *Anal. Biochem.* 119, 360 (1982).
- E)** Hecht, F., Peakman, D.C., Kaiser-McCaw, B., Robinson, A. Amniocyte clones for prenatal cytogenetics. *Amer. J. Med. Genet.* 10, 51 (1981).
- F)** Kleijer, W.J., First trimester diagnosis of genetic metabolic disorders. *Contr. Gynecol. Obstet.* 15:80. 1986.
- G)** Priest, R.E., Marimuthu, K.M., Priest J.H. Origin of human amniotic fluid cultures. *Lab. Invest.* 39, 106 (1978).
- H)** Renlund, M., and Aula P. Prenatal detection of Salla disease based upon Increased free sialic acid in amniocytes. *Amer. J. Hum. Genet.* 28, 377 (1987).
- I)** Sarkar, S., Chang, H., Porreco, R.P., Jones, O.W. Neural origin of cells in amniotic fluid. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 136, 67 (1980).
- J)** Steele, M.W. and Breg, W.R. Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. *Lancet* 1, 383 (1966).

MAIS INFORMAÇÕES

Para mais informações sobre este ou outros produtos Cytogen, contacte os Serviços Técnicos no seguinte: 49 27 72-57 20 587

Fora da Alemanha, consulte as informações do produto para o Cytogen hotline em seu território.

Você também pode contatar o seu Representante de Vendas Cytogen

Para uso diagnóstico in vitro.

ATENÇÃO: Não para uso terapêutico humano ou animal. Outros usos que não o rotulada uso pretendido pode ser uma violação da lei local.

FABRICANTE

Cytogen - Produkte für Medizin + Forschung GmbH

Bienenweg 28

D - 35764 Sinn

Alemanha

Tel. 49-2772 - 57 20 587

Fax +49 - 2772-570 945

E-Mail: CytoGen@Eurobiz.de

Web: www.CytoGen.Info