



# R-Mix Too™ FreshFrozenCells

**Ampolle di cellule congelate utilizzate nella preparazione shell-vials e piastre multi pozzetto per cellule in coltura.**

Per uso diagnostico *in vitro*.

È possibile consultare un glossario dei simboli all'indirizzo [quidel.com/glossary](http://quidel.com/glossary).



## MODALITÀ D'UTILIZZO

Le ampolle Diagnostic Hybrids R-Mix Too FreshFrozenCells [Madin-Darby canine rene (MDCK) e il carcinoma polmonare umano (A549)] destinato essere utilizzato per la produzione di culture cellulari; monostrati in flask o piastre multipozzetto.<sup>1,2</sup> Le cellule in coltura sono utili ai fini dell'isolamento di virus, in tal caso è tuttavia necessario coltivare le cellule congelate prima del loro utilizzo. È responsabilità del laboratorio stabilire il tipo di cellule da utilizzare come cellule ospiti per l'isolamento di un determinato virus.<sup>3</sup> L'uso per procedure diagnostiche in assenza di coltura non è stato stabilito.

FreshFrozenCells sono ampolle di cellule congelate in una soluzione crioprotettiva [DMSO in una base composta da MEM (mezzo essenziale minimo) e siero fetale bovino (FBS)].

## ACCORTEZZE E PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Una volta scongelate, le ampolle FreshFrozenCells non possono essere nuovamente congelate.
- Al pari di tutte le metodologie per l'identificazione di virus che fanno uso di cellule in coltura, il personale incaricato deve essere opportunamente istruito in materia di virus in coltura e tecniche di manipolazione sicure,<sup>4-5</sup> ad esempio, in virtù dei potenziali rischi per il personale, le manipolazioni devono essere realizzate in cappe di biosicurezza Classe II, indossando rigorosamente dei guanti.
- Le cellule in coltura sono indicate ai fini dell'isolamento di virus, in tal caso è tuttavia necessario seminare (coltivare) le cellule congelate prima del loro utilizzo. Le cellule R-Mix Too™ devono essere coltivate nel loro contenitore finale (es., shell-vial, piastre multipozzetto, tubi o flask).
- Le cellule in coltura utilizzate per l'identificazione di virus possono favorire la replicazione di agenti infettivi, classificati dai CDC (Centri per il controllo delle malattie) del Ministero della Sanità USA come agenti che richiedono condizioni BSL-3 per la coltura cellulare.<sup>4</sup> Consultare i CDC per raccomandazioni e per un elenco degli agenti infettivi BSL-3.
- La data di scadenza indicata sulla confezione è valida solo se il prodotto viene conservato a una temperatura non superiore a -70°C. Eventuali variazioni delle condizioni di conservazione o scongelamento possono pregiudicare la qualità del prodotto prima della scadenza.
- Prima dello smaltimento si consiglia di sterilizzare in autoclave o disinfettare campioni o colture con una soluzione di ipoclorito di sodio (diluizione al 1:10 di una soluzione di candeggina).
- I test devono essere effettuati in un'area dotata di ventilazione adeguata.
- Smaltire i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con la normativa nazionale e locale in vigore.

- Indossare indumenti protettivi, guanti, e protezione occhio/viso durante l'utilizzo del kit.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo la manipolazione.
- Per ulteriori informazioni su simboli di pericolo, sicurezza, manipolazione e smaltimento dei componenti di questo kit, consultare la scheda di sicurezza (SDS) reperibile su [quidel.com](http://quidel.com).

## ISTRUZIONI PER LA STABILITÀ E LA CONSERVAZIONE DEL PRODOTTO

### Indicazioni di instabilità e deterioramento

- Durante la conservazione le cellule potrebbero essere potenzialmente soggette a perdita di vitalità, a seconda delle temperature di conservazione del congelatore meccanico. In virtù di tale Perdita, potrebbe aumentare il tempo necessario alle cellule impiantate per raggiungere la confluenza.
- Per garantirne la vitalità è essenziale che le cellule siano ancora congelate immediatamente prima del loro utilizzo.
- Si consiglia di eliminare le cellule in coltura e mettersi in contatto con il distributore, qualora si dovessero osservare le caratteristiche o gli indicatori di deterioramento indicate di seguito:
  - ▶ Mancata confluenza delle di coltura cellulari.
  - ▶ Variazione delle caratteristiche morfologiche cellulari (arrotondamento, desquamazione, contrazione o comparsa di vacuoli).
  - ▶ La presenza torbido o gialli di coltura cellulare il mezzo (indice di una variazione del pH) indica una probabile contaminazione batterica o fungina.

### Istruzioni per la conservazione

- Le ampolle FreshFrozenCells conservate a una temperatura non inferiore a  $-70^{\circ}\text{C}$  hanno una vita di 6 mesi a partire dalla data di spedizione dagli stabilimenti di Quidel.
- Le ampolle R-Mix Too FreshFrozenCells sono trasportate in ghiaccio secco. Al momento del ricevimento, il ghiaccio secco **deve** coprire il contenitore delle ampolle. Il prodotto non deve raggiungere una temperatura superiore ai  $-70^{\circ}\text{C}$ . La totale assenza di ghiaccio secco sulla confezione, o la sua presenza in quantità minima al momento del ricevimento indica che le cellule potrebbero essersi riscaldate o scongelate, pregiudicandone la vitalità. Per eventuali istruzioni, rivolgersi al distributore.
- Una volta ricevute le ampolle, queste devono essere immediatamente trasferite in un congelatore meccanico (preferibilmente di tipo orizzontale) con una temperatura non superiore ai  $-70^{\circ}\text{C}$ , oppure in un contenitore Dewar per azoto liquido per il loro stoccaggio in fase vapore, impedendo che in nessun momento le cellule possano riscaldarsi o scongelarsi (per la loro conservazione fino alla data di scadenza del prodotto a una temperatura non superiore a c).

## ASSICURAZIONE DI QUALITÀ

- Le cellule R-Mix Too provengono da fonti affidabili, tracciabili e di elevata reputazione. Prima di essere ammesse nel centro di produzione di DHI, le cellule vengono esaminate mediante uno studio della documentazione di supporto e previi test di laboratorio, al fine di verificare che non vi siano indicatori della presenza di microrganismi (test di sterilità) e virus [assenza dell'effetto citopatico (CPE)].
- **Nota sulle linee cellulari di origine umana:** Le scorte di linee cellulari di origine umana conservate presso la banca di DHI sono state testate per attestarne la negatività al DNA virale dell'HIV e dell'HBV utilizzando tecniche di amplificazione polimerasica a catena (PCR).

### Lotto

- Prima della spedizione di ogni lotto di R-Mix Too FreshFrozenCells, i campioni:
  - ▶ Sono stati sottoposti a screening per verificare per la mancanza di *Mycoplasma spp* e ad altri microrganismi acquisiti.

- ▶ Sono stati cellulari piantati, con il successivo esame al microscopio del monostrato derivante per l'analisi di morfologia, uniformità e confluenza.
- ▶ Sono stati testati per la verifica dell'identità mediante il sistema di analisi degli isoenzimi.
- Eventuali informazioni non espressamente contenute nell'inserito prodotto, nella scheda lotto o nella scheda delle informazioni di sicurezza dei materiali sono disponibili su richiesta.

## LIMITAZIONI

Le condizioni del trasporto possono incidere sulla shelf-life delle ampole di cellule congelate in coltura. Al fine di limitare tale incidenza, occorre evitare che le ampole possano riscaldarsi o scongelarsi prima della preparazione delle flask o delle piastre multipozzetto (conservarle a una temperatura non superiore a  $-70^{\circ}\text{C}$ ). Una volta seminate, è opportuno procedere a un'analisi di tutte le colture per verificarne morfologia e aspetto prima dell'inoculazione. L'eventuale invecchiamento delle cellule in coltura dovuto al trasferimento può comportare la perdita di sensibilità in relazione alla capacità di replicazione e dell'isolamento di virus.

## COMMENTI PRELIMINARI

Le cellule in coltura garantiscono i sistemi viventi ospiti necessari per l'isolamento di organismi virali. Di norma, la procedura di isolamento virale prevede l'incubazione di un campione clinico preparato contenente una linea cellulare opportunamente permissiva (Tabella 1).<sup>7,8</sup> Il periodo di incubazione varia in funzione del virus. Il metodo di rilevamento tipico per la rilevazione di infezioni virali in colture cellulari è rappresentato dall'osservazione delle modifiche cellulari dovute all'infezione e alla replicazione del virus, noto come effetto citopatico (CPE). Di recente, si sta diffondendo in misura crescente l'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro gli antigeni specifici di un determinato agente infettivo per stabilire la presenza e l'identità dell'agente. Tale metodologia ha consentito di migliorare la sensibilità dei sistemi di colture cellulari, riducendo al contempo i tempi di rilevamento.

**Tabella 1. R-Mix Too FreshFrozenCells e i rispettivi profili di suscettibilità ai virus**

REF	Linea Cellulare/Origine	Agenti Infettivi
97-	R-Mix Too MDCK e A549* (canine rene e il carcinoma polmonare umano*)	influenza A and influenza B e adenovirus, HSV, influenza, measles, parotide, parainfluenza, poliovirus, RSV, rotavirus, VZV.
Suffisso Formato Confezione		
-00050C	ampolla "50-mer" [Sufficiente per 50 shell-vials o 50 pozzetti di una piastra a 24 pozzetti.]	
<i>Ulteriori tipologie o formati cellulari, sono disponibili su richiesta.</i>		

## PROCEDURE D'USO SUGGERITE

### Scongelamento delle cellule

1. Tutte le attività di coltura cellulare devono essere condotte utilizzando tecniche di sterilità.
2. Preriscaldare il mezzo di coltura cellulare (10-200100, Terreno di crescita per cellule; *Cell Planting Medium*) in un bagno ad acqua con temperatura compresa tra  $35^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C}$ .
3. Scongellare l'ampolla R-Mix Too FreshFrozenCells rapidamente con una delicata rotazione in un bagno ad acqua con temperatura compresa tra  $35^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C}$ .
  - ▶ Non lasciare scongelare l'ampolla per più di 4 minuti.
  - ▶ Immergere l'ampolla fino e non oltre l'attacco del coperchio; in caso contrario l'acqua del bagno potrebbe penetrare all'interno dell'ampolla, contaminando le cellule.
4. Decontaminare la parte immersa dell'ampolla salviette con alcool (o simile prodotto disinfettante). Decontaminare solo la parte dell'ampolla immersa. Evitare che l'alcol filtri all'interno dell'ampolla attraverso il coperchio. L'eventuale infiltrazione di alcol all'interno dell'ampolla danneggerebbe le cellule.

5. Utilizzando una pipetta sterile, miscelare le cellule scongelate pipettando 2-3 volte. NON UTILIZZARE VORTEX.

## Preparazione di una piastra a 24 pozzetti

1. Trasferire in un contenitore sterile 49.5-mL di mezzo di coltura cellulare (*Cell Planting Medium* 10-200100) riscaldato (a una temperatura compresa tra 35°C e 37°C).
2. Utilizzando una pipetta sterile trasferire l'intero contenuto dell'ampolla nel mezzo di coltura cellulare.
3. Miscelare le cellule con il medie da inversione o vorticoso dolce per 1 minuto circa. NON UTILIZZARE VORTEX.
4. Trasferire 1.0 mL di miscela cellulare in ciascun pozzetto delle piastra a 24 multi pozzetti o shell-vials. Preparare 50 pozzetti seguendo la medesima procedura.
5. Re-cap ogni shell-vial ermeticamente e luogo di stazionamento in rack. Il 24-pozzetti devono essere conservati in un 35°C a 37°C, 5% di CO<sub>2</sub>, di incubazione umidificata.
6. Incubare in un 35°C a 37°C, 5% di CO<sub>2</sub>, di incubazione umidificata per almeno 3 giorni. Assicurarsi di non disturbare le cellule per le prime 48 ore.
7. Verificare la confluenza dei monostrati. Un livello di confluenza compreso tra il 90% e il 100% è considerato accettabile per l'utilizzo con la maggior parte di colture cellulari.

## Inoculazione del campione

1. Eliminare il mezzo di coltura cellulare mediante (*Cell Planting Medium*) aspirazione. Se il mezzo è rimosso da decantazione, la R-Mix Too cellule devono essere sciacquati immediatamente con 1-mL di RM-03T R-Mix Refeed Media (10-330100).
2. Aggiungere alla shell-vial o pozzetto rispettivamente 1 mL di mezzo di rialimentazione (RM-03T R-Mix Refeed Medium).
3. Aggiungere un campione preparato in base alla SOP (procedure operative standard) definita.
4. Trattare le shell-vial o le piastre multipozzetto in base alla SOP definita.
5. Si consiglia di esaminare i monostrati 24 ore dopo l'inoculazione o a intervalli consigliati per verificare l'eventuale comparsa dell'effetto citopatico.

## RISULTATI

Per i risultati previsti e suggerimenti di reporting, consultare l'opportuno materiale di riferimento.

## CONTROLLO DI QUALITÀ

Per ogni gruppo di campioni testati per la presenza di virus è opportuno effettuare dei controlli delle cellule non inoculate che saranno utilizzati come controlli negativi. I controlli negativi saranno trattati esattamente come i monostrati inoculati.

I controlli dei virus positivi possono essere condotti utilizzando agenti virali previamente identificati che produrranno i risultati attesi con un campione di paziente positivo (es. CPE).

## ASSISTENZA

Per effettuare un ordine o per richiedere assistenza tecnica, contattare un rappresentante Quidel al numero 800.874.1517 (negli Stati Uniti) o al numero 858.552.1100 (per tutti gli altri Paesi), dal lunedì al venerdì, dalle 8.00 alle 17.00 (fuso orario della costa orientale degli Stati Uniti). Gli ordini possono anche essere effettuati via fax al numero +1 740.592.9820. Per l'assistenza via e-mail scrivere all'indirizzo [customerservice@quidel.com](mailto:customerservice@quidel.com) o [technicalsupport@quidel.com](mailto:technicalsupport@quidel.com).

Per l'assistenza fuori dagli Stati Uniti, contattare il distributore di zona. Per ulteriori informazioni su Quidel, i nostri prodotti e i nostri distributori, consultare il sito web [quidel.com](http://quidel.com).

## REFERENCES

1. Jacob J.P., C.M. Jones, J.P. Baille. Characteristics of a human diploid cell designated MRC5. Nature, 1970, 227: p 168 -170.
2. Holper, J.C. Characteristics of primary cultures and diploid cells - Technology of production. National Cancer Institute Monograph. 1968 No. 29 p 21-31.
3. Razonable, R.R., Paya, C.V., Smith, T.C. Role of the Laboratory in Diagnosis and Management of Cytomegalovirus Infection in Hematopoietic Stem Cell and Solid-Organ Transplant Recipients. J. Clin. Microbiol. 2002 vol. 40: 746-752.
4. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL), 5<sup>th</sup> edition, 2007, CDC-NIH manual. [<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbll5/bmbll5toc.htm>]
5. Biosafety Manual, 3<sup>rd</sup> edition, 2004. World Health Organization [Manual is available in additional languages; refer to WHO web page; [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/)]
6. Laboratory Biosafety Guidelines, 3<sup>rd</sup> edition, 2004. Published by authority of the Minister of Health, Population and Public Health Branch, Centre for Emergency Preparedness and Response [Guideline is available in French or English; refer to web page [<http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/lbg-ldmbl-04/index.html>]]
7. Viral Culture; Proposed Guideline M41-P. Vol. 26, No. 7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2006.
8. McAteer J.A., W.H.J. Douglas. Monolayer culture techniques in: W.B. Jakoby (ed): Cell culture Methods in Enzymology, 1979, Vol. 58, p 132-140, Academic Press.

**REF** 97-00050C – R-Mix Too FreshFrozen Cells

**IVD**



**EC REP**

MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover,  
Germany



**Diagnostic Hybrids, Inc. – a subsidiary of Quidel Corporation**  
2005 East State Street, Suite 100  
Athens, OH 45701 USA  
[quidel.com](http://quidel.com)

**PI0609700IT00 (06/19)**

---

**REF**

Numero di catalogo



Marcio CE di conformità

---

**EC REP**

Rappresentante autorizzato  
nella Comunità Europea

**LOT**

Codice lotto

---



Data di scadenza



Produttore

---



Limitazione di temperatura



Uso previsto

---



Leggere le istruzioni e di  
etichettatura per l'uso



Rischio biologico

---

**IVD**

Per uso diagnostico *In Vitro*

**CONT**

Contenuto / Contiene

---