

CHANG Marrow
Bone Marrow Culture Medium
with Gentamicin

Catalog No. 91031

100mL, 500mL

For *in vitro* diagnostic use.
Zur *In-vitro*-Diagnostik.
Solo per uso diagnostico *in vitro*.
Para uso diagnóstico *in vitro*.
Pour diagnostics *in vitro*.
Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
Pro diagnostické použití *in vitro*.
Til *in vitro*-diagnostik.
In vitro -diagnostikkaan.
Lietošanai *in vitro* diagnostikā.
Uitsluitend voor *in vitro* diagnostisch gebruik.
Do diagnostyki *in vitro*.
Pentru uz diagnostic *in vitro*.
För *in vitro*-diagnostik.
In vitro diagnostiliseks kasutamiseks.
In vitro diagnosztikai alkalmazáshoz.
Skirta *in vitro* diagnostikai.
In vitro diagnostik kullanim için.
Na diagnostické použitie *in vitro*.
За *in vitro* диагностична употреба.
За употребу *in vitro* dijagnostici.
Ghal užu dijanjostiku *in vitro*.
Za diagnostično uporabo *in vitro*.

REFERENCES

Tijo, JH, and Whang-Peng,J: Direct Preparation of Bone Marrow Cells. Human Chromosome Methodology (JJ Yunis, ed.), Academic Press, New York, 1974.
Hozier, JC, and Lindquist,L: Banded Karyotypes from Bone Marrow: A Clinically Useful Approach. Human Genetics, 53:205-209, 1980.
Williams, DL, et al: A Direct Bone Marrow Chromosome Technique for Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer Genetics and Cytogenetics, 13:239-257, 1984.
Babior, B, and Stossel, T: Hematology, A Patho-physiological Approach, Churchill-Livingstone, Inc., New York 1990.
LeBeau, M: Cytogenetic Analysis of Hematologic Malignant Diseases. ACT Cytogenetics Laboratory Manual, Raven Press, New York, 1991.
Mitelman, F: Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer (4th ed.), Alan Liss, New York, 1991.
Kaplan, B, and Dale, K (eds): The ACT Cytogenetic Symposia, CA 1994.
Mitelman, F, and Heim, S: Cancer Cytogenetics, Wiley-Liss, New York, 1995.

REF

LOT

STERILE A



Expiration:
Year - Month - Day



Caution, consult accompanying documents



Consult instructions for use



Storage Temperature
store below -10°C



Do not resterilize



Do not use if package is damaged



Manufacturer



CE Mark



Emergo Europe - Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

*Symbol Reference - EN ISO 15223-1, Medical devices –
Symbols to be used with medical device labels, labeling.

INDICATION FOR USE
CHANG Marrow is intended for use in primary culture of clinical Human Bone Marrow Cultures for karyotyping and other genetic testing of various hematological disorders.

DEVICE DESCRIPTION
CHANG Marrow is a ready-to-use medium consisting of IMDM, with FBS, HEPES buffer, L-glutamine, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium, Recombinant Human GM-CSF and Gentamicin Sulfate. CHANG Marrow has been optimized to support efficient growth of bone marrow cells for cytogenetic analysis. No addition of any components prior to culturing bone marrow is required. CHANG Marrow contains Gentamicin Sulfate (50 mg/L). Additional antibiotics may be added if desired.

COMPONENTS		
Amino Acids	Proteins, Hormones, and Growth Factors	Energy Substrates
Alanine		Glucose
Arginine		Pyruvate
Asparagine		Inositol
Aspartic Acid	Fetal bovine serum	
Cystine	(FBS)	Antibiotic
Glutamic Acid	hrGM-CSF	Gentamicin Sulfate
Glutamine		
Glycine	Salts & Ions	Other
Histidine	Sodium chloride	Biotin
Isoleucine	Sodium selenite	Giant cell tumor conditioned medium (GCT-CM)
Leucine	Calcium chloride	
Lysine	Choline chloride	
Methionine	Potassium chloride	Vitamins and trace elements
Phenylalanine	Potassium nitrate	Folic acid
Proline	Magnesium sulfate	Nicotinamide
Serine	Sodium phosphate	Riboflavin
Threonine		Thiamine
Tryptophan	Buffers	Pantothenic acid
Tyrosine	Sodium bicarbonate	Cobalamin
Valine	HEPES	Pyridoxine
		Water
		WFI Quality

QUALITY ASSURANCE
Several factors including source of specimens, culture conditions and selection of reagents can influence the result obtained. Users are advised to run each new batch of reagent in parallel with reference material of known suitable activity before adoption in routine use. Each lot of CHANG Marrow has been performance tested on Clinical Bone Marrow Cultures at an independent Clinical Cytogenetics Laboratory compared to a control medium. Results are reported on a lot specific Certificate of Analysis.

MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Plastic Sterile Centrifuge Tubes and Culture Flasks
2. CO₂ Incubator at 37°C
3. Bench Centrifuge
4. Vortex Mixer
5. Colcemid Stock Solution, 10 µg/mL
6. Potassium Chloride Solution, 0.075 M
7. Fixative Solution, Methanol:Acetic Acid (3:1)

PREPARATION FOR USE
Thaw overnight in the refrigerator (2 - 8°C), then gently mix to ensure homogeneity. Aseptically dispense 10 mL of medium into sterile culture flasks and equilibrate to 37°C for immediate use.

DIRECTIONS FOR USE
I. Sample Preparation:
Use 0.5 to 1.0 mL of sodium heparinized bone marrow aspirate. Lithium heparin, EDTA, or citrate anticoagulants are unsuitable for cytogenetic studies.

- If more than 5 mL of bone marrow aspirate is received, the sample may be hemodilute. Spin the specimen down at 1,200 rpm for 8 minutes to isolate the bone marrow fraction.

- If the specimen arrives in transport medium, spin the sample down at 1,200 rpm for 8 minutes and remove the transport medium (supernatant). Inoculate using the remaining spun-down fraction in the bottom of the tube.

For additional details on the use of these products, each laboratory should consult its own laboratory procedures and protocols which have been specifically developed and optimized for your individual medical program.

II. Bone Marrow Culture:
Label all culture vessels with patient name, specimen number, and culture type.

1. Before inoculation of specimen bring CHANG Marrow to ambient temperature.
2. Inoculate each culture with the appropriate amount of sample to achieve an optimal concentration of 1x10⁶ cells/mL or 10 x 10⁶ cells per 10 mL culture.
3. Each individual laboratory should determine the number of cultures to set up depending on the clinical indication of the patient. Additional growth factors may be added if desired.
4. Incubate cultures at 35 - 39°C, 5–8% CO₂ atmosphere until ready for harvest.

Harvesting the Cultures:

1. Remove the culture ready for harvest from the incubator and gently swirl flask to re-suspend cells.
2. Transfer the contents of each flask to a 15 mL centrifuge tube.
3. Add 40 µL of stock Colcemid (10µg/mL) to each culture tube. Tightly cap tubes and mix gently by inverting.
4. Incubate tubes at 35-39°C, for 45 minutes.
5. After incubation, centrifuge tubes for 8 minutes at 1,000 rpm.
6. Carefully aspirate supernatant from each tube using a vacuum aspirator, with solvent trap. Be careful to not aspirate pellet.
7. Resuspend cell pellet by tapping bottom or side of each tube with finger.
8. Initiate a 20 minute timer.
9. Add 3 - 4 mL dropwise, of prewarmed (35 - 37°C) hypotonic solution (0.075M Potassium Chloride).
10. Tightly cap tube and mix gently by tapping bottom or side of the tube with finger.
11. Add 5 - 6 mL dropwise, of prewarmed (35 - 37°C) hypotonic solution. Tightly cap tube and invert tube.
12. Repeat Steps 9 - 11 for each tube.
13. Using a water bath, allow tubes to stand at 35 - 37°C. Invert tubes once at midpoint of 20 minute timer.
14. At the end of the 20 minute timer, remove tubes from water bath and add 1 mL of fresh 3:1 Carnoy's Fixative to each tube. Tightly cap and invert each tube. (This is the Pre-Fixative step)
15. Centrifuge tubes for 8 minutes at 1,000 rpm.
16. Aspirate supernatant from each tube, leaving about 1 mL above the cell pellet. Be careful to not aspirate pellet. Be cautious of fibrous material that may extend from the cell pellet up into the supernatant after centrifugation. The last few mL of supernatant may need to be removed by hand with a Pasteur pipette (not using vacuum aspiration) to avoid aspirating the entire cell pellet into the waste container.
17. Resuspend cell pellet, as described in Step 7.
18. Add 3 - 4 mL dropwise of fresh 3:1 Carnoy's Fixative.
19. Add remaining fixative up to 7 mL.
20. Repeat steps 16 - 19 for each tube.
21. Let stand for 10 minutes at room temperature. (This is the First fixative step).
22. Centrifuge tubes for 8 minutes at 1,000 rpm.

23. Aspirate supernatant leaving about 1 mL above pellet. Resuspend cell pellet.
24. Add fix, up to 7 mL. Centrifuge tubes for 8 minutes at 1,000 rpm. (Second fixative step).
25. Repeat steps 22 - 23. (Third fixative step).
26. At this point, fixed cells pellets can be used immediately for slide preparation according to the laboratory standard protocol or stored in the refrigerator (2 -8°C) or freezer for future use.

STORAGE AND STABILITY
CHANG Marrow should be stored frozen below –10°C until ready to use. CHANG Marrow is stable until the expiration date shown on the bottle label when stored frozen. After thawing, any unused product can be dispensed into working aliquots and refrozen for later use, or tightly capped and stored at 2 - 8°C for up to 30 days. Protect from fluorescent light.

PRECAUTIONS AND WARNINGS
This device is intended to be used by staff trained in procedures that include the indicated application for which the device is intended.

CHANG Marrow contains FBS and GCT conditioned medium and should be handled with universal laboratory precautions. The medium contains an antibiotic (gentamicin sulfate) to reduce the potential of bacterial contamination, but aseptic techniques should always be used when dispensing the medium. Do not use any medium that is not red in color.

DEUTSCH

INDIKATIONEN

Das CHANG Marrow ist für die Verwendung in der Primärkultivierung klinischer humaner Knochenmarkkulturen für die Karyotypisierung und andere Gentests auf verschiedene hämatologische Erkrankungen vorgesehen.

PRODUKTBESCHREIBUNG

Das CHANG Marrow ist ein gebrauchsfertiges Medium, bestehend aus IMDM mit FBS, HEPES-Puffer, L-Glutamin, konditioniertem Riesenzelltumormedium (GCT), rekombinantem Human-GM-CSF und Gentamicinsulfat. Das CHANG Marrow ist für effizientes Wachstum von Knochenmarkzellen für die zytogenetische Analyse optimiert. Für die Kultivierung des Knochenmarks ist keine vorherige Zugabe zusätzlicher Stoffe erforderlich. CHANG Marrow enthält Gentamicinsulfat (50 mg/l). Bei Bedarf können zusätzliche Antibiotika hinzugefügt werden.

INHALTSSTOFFE

Aminosäuren	Proteine, Hormone und Wachstumsfaktoren	Antibiotikum
Alanin		Gentamicinsulfat
Arginin		
Asparagin	Fetales	Andere
Asparaginsäure	Kälberserum (FBS)	Biotin
Cystin	hrGM-CSF	Riesenzelltumorkonditioniertes
Glutaminsäure		Medium (GCT-CM)
Glutamin	Salze und Ionen	
Glycin	Natriumchlorid	
Histidin	Natriumselenit	Vitamine und Spurenelemente
Isoleucin	Calciumchlorid	Folsäure
Leucin	Cholinchlorid	Nikotinamid
Lysin	Kaliumchlorid	Riboflavin
Methionin	Kaliumnitrat	Thiamin
Phenylalanin	Magnesiumsulfat	Pantothensäure
Prolin	Natriumphosphat	Cobalamin
Serin		Pyridoxin
Threonin	Puffer	
Tryptophan	Natriumbicarbonat	Wasser
Tyrosin	HEPES	Wasser für Injektionszwecke (WFI)
Valin		
	Energiesubstrate	
	Glukose	
	Pyruvat	
	Inositol	

QUALITÄTSSICHERUNG

Das resultierende Ergebnis kann durch mehrere Faktoren wie unter anderem durch Probenherkunft, Kulturbedingungen und Auswahl der Reagenzien beeinflusst werden. Es wird empfohlen, jede neue Reagenzcharge vor dem Einsatz im Routinebetrieb parallel mit Referenzmaterial bekannter geeigneter Aktivität zu analysieren. Die Leistungsdaten jeder Charge CHANG Marrow wurden mittels klinischer Knochenmarkkulturen in einem unabhängigen Labor für klinische Zytogenetik geprüft und einem Kontrollmedium gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind auf einem chargenspezifischen Analysezertifikat angegeben.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN UND HILFSSTOFFE (NICHT IM LIEFERUMFANG)

1. Sterile Zentrifugenröhrchen und Kulturflaschen aus Kunststoff
2. CO₂-Inkubator bei 37 °C
3. Tischzentrifuge
4. Vortexmischer
5. Colcemid-Ansatzlösung, 10 µg/ml
6. Kaliumchloridlösung, 0,075 M
7. Fixierlösung, Methanol: Essigsäure (3:1)

VORBEREITUNG

Über Nacht im Kühlschrank (2–8 °C) auftauen und anschließend zur Gewährleistung von Homogenität behutsam mischen. Unter Anwendung aseptischer Techniken 10 ml Medium in sterile Kulturflaschen geben und zur sofortigen Verwendung auf 37 °C erwärmen.

GEBRAUCHSANWEISUNG

I. Probenvorbereitung:

0,5 bis 1,0 ml natriumheparinisiertes Knochenmarkspirat verwenden. Lithium-Heparin-, EDTA- oder Citrat-Antikoagulanzen sind für zytogenetische Studien nicht geeignet.

- Wurden mehr als 5 ml Knochenmarkspirat erhalten, ist die Probe möglicherweise hämodiluiert. Die Probe 8 Minuten bei 1.200 U/min herunterzentrifugieren, um die Knochenmarkfraktion zu isolieren.
- Wenn die Probe in einem Transportmedium geliefert wurde, die Probe 8 Minuten bei 1.200 U/min herunterzentrifugieren und das Transportmedium (Überstand) entfernen. Mit der am Röhrchenboden verbliebenen herunterzentrifugierten Fraktion beimpfen.

Weitere Einzelheiten zum Gebrauch dieser Produkte sind den Verfahren und Vorschriften des jeweiligen Labors zu entnehmen, die eigens für das jeweilige medizinische Programm entwickelt und optimiert wurden.

II. Knochenmarkkultur:

Alle Kulturgefäße mit Patientennamen, Probennummer und Kulturtyp beschriften.

1. CHANG Marrow vor der Beimpfung mit Probe auf Umgebungstemperatur bringen.
2. Jede Kultur mit einer geeigneten Probenmenge beimpfen, um eine optimale Konzentration von 1x10⁴ Zellen/ml oder 10x10⁴ Zellen pro 10 ml Kultur zu erhalten.
3. Jedes Labor ist selbst für die Bestimmung der Anzahl der anzusetzenden Kulturen in Abhängigkeit von der klinischen Indikation des Patienten zuständig. Bei Bedarf können zusätzliche Wachstumsfaktoren hinzugefügt werden.
4. Kulturen bis zur Entnahme bei 35–39 °C in einer 5–8%igen CO₂-Atmosphäre inkubieren.

Kulturentnahme:

1. Die zur Entnahme bereite Kultur aus dem Inkubator nehmen und die Flasche zur Resuspensionierung der Zellen leicht schwenken.
2. Den Inhalt jeder Flasche in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen übertragen.
3. In jedes Kulturröhrchen 40 µl Colcemid (10 µg/ml) geben. Die Röhrchen fest verschließen und durch Umdrehen behutsam mischen.
4. Die Röhrchen 45 Minuten lang bei 35–39 °C inkubieren.
5. Die Röhrchen im Anschluss an die Inkubation 8 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugieren.
6. Anhand eines Absauggeräts mit Lösemittelfalle vorsichtig den Überstand von jedem Röhrchen absaugen. Darauf achten, dass kein Pellet abgesaugt wird.
7. Den Boden oder die Seite jedes Röhrchens mit dem Finger antippen, um Zellpellet zu resuspendieren.
8. Einen 20-Minuten-Zeitgeber starten.
9. Tropfenweise 3–4 ml vorgewärmter (35–37 °C) hyptononer Lösung (0,075 M Kaliumchlorid) zugeben.
10. Das Röhrchen fest verschließen und zum behutsamen Mischen mit dem Finger am Boden oder an der Seite antippen.
11. Tropfenweise 5–6 ml vorgewärmter (35–37 °C) hyptononer Lösung zugeben. Das Röhrchen fest verschließen und umdrehen.
12. Die Schritte 9–11 für jedes Röhrchen wiederholen.
13. Die Röhrchen in einem Wasserbad bei 35–37 °C stehen lassen. Nach Ablauf der Hälfte des 20-Minuten-Zeitgebers die Röhrchen einmal umdrehen.

14. Nach Ablauf des 20-Minuten-Zeitgebers die Röhrchen aus dem Wasserbad nehmen und jedem Röhrchen 1 ml frisches 3:1-Carnoy-Fixiermittel zusetzen. Jedes Röhrchen fest verschließen und umdrehen. (Dies ist der Schritt zur Vorbereitung der Fixierung.)
15. Die Röhrchen 8 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugieren.
16. So viel Überstand von jedem Röhrchen absaugen, dass oberhalb des Zellpellets 1 ml zurückbleibt. Darauf achten, dass kein Pellet abgesaugt wird. Auf Fasermaterial achten, das möglicherweise nach der Zentrifugation vom Zellpellet in den Überstand hinaufragt. Die letzten Milliliter Überstand müssen eventuell von Hand mit einer Pasteurpipette entfernt werden (ohne Vakuumaspiration), um zu verhindern, dass das ganze Zellpellet in den Abfallbehälter gesaugt wird.
17. Das Zellpellet wie in Schritt 7 beschrieben resuspendieren.
18. Tropfenweise 3–4 ml frisches 3:1-Carnoy-Fixiermittel zugeben.
19. Restliches Fixiermittel auf bis zu 7 ml zugeben.
20. Die Schritte 16–19 für jedes Röhrchen wiederholen.
21. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen lassen. (Dies ist der erste Fixierungsschritt.)
22. Die Röhrchen 8 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugieren.
23. So viel Überstand absaugen, dass etwa 1,0 ml über dem Pellet verbleibt. Das Zellpellet resuspendieren.
24. Fixiermittel auf 7 ml zugeben. Die Röhrchen 8 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugieren. (Dies ist der zweite Fixierungsschritt.)
25. Schritte 22–23 wiederholen. (Dies ist der dritte Fixierungsschritt.)
26. An diesem Punkt können fixierte Zellpellets sofort für die Objektträgerpräparation gemäß dem Standardprotokoll des Labors verwendet oder zur späteren Verwendung im Kühlschrank (2–8 °C) oder Gefrierschrank aufbewahrt werden.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Das CHANG Marrow sollte bis zur Verwendung unter -10 °C tiefgekühlt gelagert werden. Bei Tiefkühlagerung ist das CHANG Marrow bis zu dem auf dem Flaschenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Nach dem Auftauen kann jegliches unbenutzte Produkt in Arbeitsaliquote abgefüllt und zur späteren Verwendung wieder eingefroren oder fest verschlossen und bei 2–8 °C bis zu 30 Tage gelagert werden. Keinem Fluoreszenzlicht aussetzen.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

Das Produkt ist für den Gebrauch durch Personal vorgesehen, das in Verfahren geschult ist, die den für das Produkt vorgesehenen Anwendungsbereich umfassen.

Das CHANG Marrow enthält FBS- und GCT-konditioniertes Medium und muss unter Einhaltung der in Laboren universell geltenden Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden. Das Medium enthält ein Antibiotikum (Gentamicinsulfat), um das Risiko einer bakteriellen Kontamination zu verringern. Bei der Abgabe des Mediums sollten jedoch immer aseptische Techniken angewendet werden. Keine Medien verwenden, die nicht rot sind.

ITALIANO

INDICAZIONI PER L'USO

CHANG Marrow è indicato per l'uso in colture primarie di cellule di midollo osseo umano di classe clinica per la determinazione del cariotipo e altri test genetici relativi a vari disturbi ematologici.

DESCRIZIONE DEL DISPOSITIVO

CHANG Marrow è un terreno pronto all'uso composto da IMDM (terreno Iscove modificato Dulbecco), con l'aggiunta di siero bovino fetale, tampone HEPES, L-glutamina, terreno condizionato da tumore a cellule giganti (GCT), fattore stimolante le colonie granulocitarie-macrofagiche (GM-CSF) ricombinante umano e gentamicina solfato. CHANG Marrow è stato ottimizzato per favorire un'efficace crescita di cellule di midollo osseo per l'analisi citogenica. Non è necessario aggiungere alcun altro componente prima di avviare la coltura delle cellule di midollo osseo. CHANG Marrow contiene gentamicina solfato (50 mg/l). È possibile aggiungere ulteriori antibiotici, se lo si ritiene necessario.

COMPONENTI

Aminoacidi	Proteine, ormoni e fattori di crescita	Antibiotico
Alanina	Siero bovino fetale	Gentamicina solfato
Arginina	GM-CSF umano	
Asparagina	ricombinato	Altro
Acido aspartico		Biotina
Cistina		Terreno condizionato da tumore a cellule giganti (GCT-CM)
Acido glutammico	Salì e ioni	
Glutamina	Cloruro di sodio	
Glicina	Selenio di sodio	
Istidina	Cloruro di calcio	Vitamine ed elementi in tracce
Isoleucina	Cloruro di colina	
Leucina	Cloruro di potassio	Acido folico
Lisina	Nitrato di potassio	Nicotinamide
Metionina	Solfato	Riboflavina
Fenilalanina	di magnesio	Tiamina
Prolina	Fosfato di sodio	Acido pantoténico
Serina		Cobalamina
Treonina	Tamponi	Pridossina
Triptofano	Bicarbonato di sodio	
Tirosina	Acqua	
Valina	Qualità WFI (acqua per iniezioni)	
	Substrati energetici	
	Glucosio	
	Piruvato	
	Inositol	

GARANZIA DI QUALITÀ

Diversi fattori, tra cui l'origine dei campioni, le condizioni di coltura e la scelta dei reagenti, possono influenzare il risultato ottenuto. Quando si introduce un nuovo lotto di reagenti, prima di adottarlo nell'uso di routine, è consigliabile usarlo in parallelo a materiale di riferimento avente idonea attività nota. Ogni lotto di CHANG Marrow è stato valutato ai fini delle prestazioni su colture di midollo osseo di classe clinica presso un laboratorio di citogenetica clinica indipendente, confrontandolo con terreno di controllo. I risultati sono riportati nel Certificato di analisi specifico di ogni lotto.

MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI MA NON FORNITI

1. Provette di plastica sterili per centrifuga e fiasche per coltura
2. Incubatore con CO₂ a 37 °C
3. Centrifuga da banco
4. Miscelatore Vortex
5. Soluzione stock di Colcemid, 10 µg/ml
6. Soluzione di cloruro di potassio, 0,075 M
7. Soluzione fissativa: metanolo:acido acetico (3:1)

PREPARAZIONE PER L'USO

Scongelare il terreno per una notte in frigorifero (2-8 °C) e poi miscelarlo delicatamente per renderlo omogeneo. Dispensarne in condizioni di sterilità 10 ml in fiasche per coltura sterili e portare a 37 °C per l'uso immediato.

ISTRUZIONI PER L'USO

I. Preparazione del campione

Usare da 0,5 a 1,0 ml di aspirato midollare in eparina sodica. La lito eparina, l'EDTA o gli anticoagulanti con citrato non sono indicati per studi citogenetici.

- Qualora si utilizzino più di 5 ml di aspirato midollare, il campione può essere emodiluito. Centrifugare il campione a 1.200 giri/min per 8 minuti per isolare la frazione di midollo osseo.
- Se il campione arriva in un terreno di trasporto, centrifugarlo a 1.200 giri/min per 8 minuti per farlo depositare e rimuovere il terreno di trasporto (surnatante). Inoculare usando la frazione depositata restante sul fondo della provetta.

Per ulteriori dettagli sull'uso di questi prodotti, il laboratorio deve consultare le procedure e i protocolli specificamente sviluppati e ottimizzati per il proprio programma medico.

II. Coltura di midollo osseo

Etichettare tutti i contenitori culturali con il nome del paziente, il numero del campione e il tipo di coltura.

1. Prima di inoculare il campione, portare CHANG Marrow a temperatura ambiente.
2. Inoculare ogni coltura con la quantità di campione appropriata a ottenere la concentrazione ottimale di 1 x 10⁴ cellule/ml o 10 x 10⁴ cellule per 10 ml di coltura.
3. Ogni laboratorio dovrà determinare il numero di colture da predisporre, in funzione delle indicazioni cliniche del paziente. È possibile aggiungere ulteriori fattori di crescita, se lo si ritiene necessario.
4. Incubare le colture a 35-39 °C, in atmosfera a 5-8% di CO₂, finché non sono pronte per la raccolta.

Raccolta delle colture

1. Rimuovere dall'incubatore la coltura pronta per la raccolta e fare roteare delicatamente il contenuto della fiasca per risospendere le cellule.
2. Trasferire il contenuto di ogni fiasca in una provetta per centrifuga da 15 ml.
3. Aggiungere 40 µl di Colcemid soluzione stock (10 µg/ml) a ogni provetta contenente la coltura. Chiudere bene le provette e miscelare capovolgendole.
4. Incubare le provette a 35-39 °C per 45 minuti.
5. Dopo l'incubazione, centrifugare le provette per 8 minuti a 1.000 giri/min.
6. Aspirare con attenzione il surnatante da ogni provetta mediante una pompa a vuoto, con un filtro per il solvente. Prestare attenzione a non aspirare il pellet.
7. Risospendere il pellet cellulare battendo con il dito sul fondo o sul lato di ogni provetta.
8. Avviare un intervallo di 20 minuti su un cronometro.
9. Aggiungere, goccia a goccia, 3-4 ml di soluzione ipotonica (cloruro di potassio 0,075 M) preriscaldata (35-37 °C).
10. Chiudere bene la provetta e agitare delicatamente battendo con il dito sul fondo o sul lato della stessa.
11. Aggiungere, goccia a goccia, 5-6 ml di soluzione ipotonica preriscaldata (35-37 °C). Chiudere bene la provetta e capovolgerla.
12. Ripetere i passaggi 9-11 per ogni provetta.
13. Lasciare le provette in un bagno d'acqua a 35-37 °C. Capovolgere a metà dell'intervallo di 20 minuti sul cronometro.
14. Alla fine dell'intervallo di 20 minuti sul cronometro, estrarle dal bagno d'acqua e aggiungere 20 ml di fissativo di Carnoy 3:1 appena preparato a ciascuna provetta. Chiudere bene la provetta e capovolgerla. (Questo è il passaggio preliminare dell'uso del fissativo.)

15. Centrifugare le provette per 8 minuti a 1.000 giri/min.
16. Aspirare il supernatante da ciascuna provetta, lasciando circa 1 ml sopra il pellet cellulare. Fare attenzione sia a non aspirare il pellet che al materiale fibroso che potrebbe estendersi dal pellet nel surnatante dopo la centrifugazione. Potrebbe essere necessario rimuovere gli ultimi ml di surnatante mediante una pipetta Pasteur (non usare la pompa a vuoto) per evitare di aspirare tutto il pellet nel contenitore di scarico.
17. Risospendere il pellet cellulare come descritto al punto 7.
18. Aggiungere, goccia a goccia, 3-4 ml di fissativo di Carnoy 3:1 appena preparato.
19. Aggiungere il fissativo rimanente sino a raggiungere il volume di 7 ml nella provetta.
20. Ripetere i passaggi 16-19 per ogni provetta.
21. Lasciare riposare per 10 minuti a temperatura ambiente (questo è il primo passaggio dell'uso del fissativo).
22. Centrifugare le provette per 8 minuti a 1.000 giri/min.
23. Aspirare il supernatante lasciando circa 1 ml sopra il pellet. Risospendere il pellet.
24. Aggiungere il fissativo sino a 7 ml. Centrifugare le provette per 8 minuti a 1.000 giri/min (secondo passaggio dell'uso del fissativo).
25. Ripetere i passaggi 22-23 (terzo passaggio dell'uso del fissativo).
26. A questo punto, i pellet cellulari fissati possono essere adoperati immediatamente per preparare il vetrino secondo il protocollo standard del laboratorio oppure conservati in frigorifero a 2-8 °C o nel congelatore per essere utilizzati successivamente.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

CHANG Marrow deve essere conservato congelato a temperatura inferiore a -10 °C fino al momento dell'uso. Se conservato congelato, è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del flacone. Dopo lo scongelamento, il prodotto non utilizzato può essere dispensato in aliquote idonee all'utilizzo e ricongelato per utilizzarlo successivamente, oppure chiuso bene e conservato a 2-8 °C fino a 30 giorni. Proteggere da luce fluorescente.

PRECAUZIONI E AVVERTENZE

Questo prodotto è destinato all'uso da parte di personale addestrato nelle procedure che comprendono l'applicazione prevista del prodotto stesso.

CHANG Marrow contiene terreno condizionato da GCT e siero bovino fetale e deve essere maneggiato secondo le normali precauzioni di laboratorio. Il terreno contiene un antibiotico (gentamicina solfato) per ridurre la potenziale contaminazione da batteri, tuttavia è necessario usare sempre tecniche in asepsi mentre si dispensa il terreno. Non utilizzare il terreno qualora non si presenti di colore rosso.

ESPAÑOL

INDICACIÓN DE USO

El CHANG Marrow está diseñado para utilizarse en cultivos clínicos de médula ósea humana para cariotipado y otras pruebas genéticas de diversos trastornos hematológicos.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El CHANG Marrow es un medio listo para usar que se compone del IMDM, con FBS, tampón HEPES, L-glutamina, medio acondicionado con tumor de células gigantes (GCT), GM-CSF humano recombinante y sulfato de gentamicina. El CHANG Marrow se ha optimizado para fomentar un crecimiento eficiente de las células de la médula ósea sometidas a análisis citogenético. No es necesario añadir ningún componente antes de cultivar la médula ósea. El CHANG Marrow contiene sulfato de gentamicina (50 mg/l). Se pueden añadir antibióticos si se desea.

COMPONENTES

<u>Aminoácidos</u>	<u>Proteínas, hormonas y factores de crecimiento</u>	<u>Antibiótico</u>
Alanina	Sulfato de gentamicina	
Arginina	Suero bovino fetal (FBS)	
Asparagina	Otros	
Ácido aspártico	hrGM-CSF	
Cistina	Biotina	
Ácido glutámico	Medio acondicionado con tumor de células gigantes (GCT-CM)	
Glutamina	<u>Sales e iones</u>	
Glicina	Cloruro sódico	
Histidina	Selenito sódico	
Isoleucina	Cloruro cálcico	
Leucina	Cloruro de colina	<u>Vitaminas</u>
Lisina	Cloruro potásico	y <u>oligoelementos</u>
Metionina	Nitrato potásico	Ácido fólico
Fenilalanina	Sulfato magnésico	Nicotinamida
Prolina	Fosfato sódico	Riboflavina
Serina		Tiamina
Treonina	<u>Sistemas tampón</u>	Ácido pantoténico
Triptófano	Bicarbonato sódico	Cobalamina
Tirosina	HEPES	Piridoxina
Valina	<u>Sustratos energéticos</u>	<u>Agua</u>
	Glucosa	Calidad de agua para inyectables
	Piruvato	
	Inositol	

GARANTÍA DE CALIDAD

Diversos factores, entre ellos la fuente de las muestras, las condiciones de cultivo y la selección de los reactivos, pueden influir en el resultado obtenido. Se aconseja a los usuarios que procesen cada nuevo lote de reactivo en paralelo con un material de referencia de actividad idónea y conocida antes de su adopción sistemática. El rendimiento de cada lote del CHANG Marrow se ha analizado frente a un medio de control en cultivos clínicos de médula ósea en un laboratorio de citogenética clínica independiente. Los resultados se notifican en un certificado de análisis específico del lote.

MATERIAL Y EQUIPO NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Tubos de centrifuga estériles de plástico y frascos de cultivo
2. Incubadora de CO₂ a 37 °C
3. Centrifuga de mesa
4. Agitador vórtex
5. Solución madre Colcemid, 10 µg/ml
6. Solución de cloruro potásico, 0,075 M
7. Solución fijadora, metanol: ácido acético (3 : 1)

PREPARACIÓN PARA EL USO

Descongelar durante la noche en el frigorífico (2-8 °C) y luego mezclar con suavidad para garantizar su homogeneidad. Dispensar en condiciones asépticas 10 ml del medio en frascos de cultivo estériles y equilibrar a 37 °C para su uso inmediato.

INSTRUCCIONES DE USO

I. Preparación de la muestra:

Utilizar de 0,5 a 1,0 ml de médula ósea aspirada en un tubo de heparina sódica. La heparina de litio, el EDTA y los anticoagulantes de citrato no resultan adecuados para estudios citogenéticos.

- Si se reciben más de 5 ml de aspirado de médula ósea, la muestra podría estar hemodiluida. Centrifugar la muestra a 1200 rpm durante 8 minutos para aislar la fracción de médula ósea.
- Si la muestra llega en un medio de transporte, centrifugarla a 1200 rpm durante 8 minutos y eliminar el medio de transporte (sobrenadante). Inocular la fracción centrifugada que permanece en el fondo del tubo.

Para más detalles sobre la utilización de estos productos, consultar los protocolos y los procedimientos de su propio laboratorio, que se habrán desarrollado y optimizado específicamente de acuerdo con su programa médico particular.

II. Cultivo de médula ósea:

Etiquetar todos los recipientes de cultivo con el nombre del paciente, el número de la muestra y el tipo de cultivo.

1. Antes de inocular la muestra, dejar que el CHANG Marrow alcance la temperatura ambiente.
2. Inocular cada cultivo con la cantidad apropiada de muestra para lograr una concentración óptima de 1x10⁴ células/ml o 10x10⁶ células por cada 10 ml de cultivo.
3. Cada laboratorio determinará el número requerido de cultivos dependiendo de la indicación clínica de paciente. Se pueden añadir otros factores de crecimiento si se desea.
4. Incubar los cultivos a 35-39 °C en una atmósfera con 5-8 % de CO₂ hasta que se encuentren listos para la cosecha.

Cosecha de los cultivos:

1. Retirar de la incubadora el cultivo listo para cosechar y balancearlo con suavidad para resuspender las células.
2. Transferir el contenido del frasco a un tubo de centrífuga de 15 ml.
3. Añadir 40 µl de la solución madre Colcemid (10 µg/ml) a cada tubo de cultivo. Tapar herméticamente los tubos y mezclar con suavidad mediante inversión.
4. Incubar el frasco a 35-39 °C durante 45 minutos.
5. Después de la incubación, colocar los tubos de centrífuga durante 8 minutos a 1000 rpm.
6. Aspirar con cuidado el sobrenadante de cada tubo empleando una aspiradora de vacía con trampa de disolvente. Tener cuidado de no aspirar el sedimento.
7. Resuspender el sedimento celular dando un toquecito con el dedo sobre la parte inferior o lateral de cada tubo.
8. Poner en marcha un temporizador de 20 minutos.
9. Añadir gota a gota 3-4 ml de solución hipotónica (cloruro potásico 0,075M) precalentada (35-37 °C).
10. Cerrar herméticamente el tubo con la tapa y mezclar suavemente dando un toquecito con el dedo sobre la parte inferior o lateral de cada tubo.
11. Añadir gota a gota 5-6 ml de solución hipotónica precalentada (35-37 °C). Cerrar herméticamente el tubo con la tapa e invertirlo.
12. Repetir los pasos 9-11 con cada uno de los tubos.
13. Dejar que los tubos reposen en vertical en un baño de agua a 35-37 °C. Invertir los tubos una vez a la mitad del periodo cronometrado de 20 minutos.

14. Al final de dicho periodo de 20 minutos, retirar los tubos del baño de agua y añadir a cada tubo 1 ml de solución fijadora de Carnoy recién preparada con una proporción 3 : 1. Cerrar herméticamente cada tubo con su tapa e invertirlos todos. (Este el paso prefijador).
15. Centrifugar los tubos durante 8 minutos a 1000 rpm.
16. Aspirar el sobrenadante de cada tubo dejando aprox. 1 ml por encima del sedimento celular. Tener cuidado de no aspirar el sedimento. Tenga cuidado con el material fibroso que puede extenderse desde el sedimento celular hasta el sobrenadante después de la centrifugación. Para evitar la aspiración de todo el sedimento celular en el recipiente de desecho, los últimos mililitros de sobrenadante se deben a veces aspirar a mano (sin aplicar vacío) con una pipeta Pasteur.
17. Resuspender el sedimento celular como se describe en el paso 7.
18. Añadir gota a gota 3-4 ml de solución fijadora de Carnoy recién preparada con una proporción 3 : 1.
19. Añadir el fijador restante hasta 7 ml.
20. Repetir los pasos 16-19 con cada uno de los tubos.
21. Dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente. (Este el primer paso fijador).
22. Centrifugar los tubos durante 8 minutos a 1000 rpm.
23. Aspirar el sobrenadante dejando aproximadamente 1 ml por encima del sedimento celular. Resuspender el sedimento celular.
24. Añadir fijador hasta 7 ml. Centrifugar los tubos durante 8 minutos a 1000 rpm. (Segundo paso fijador).
25. Repita los pasos 22-23. (Tercer paso fijador).
26. En este momento, los sedimentos celulares fijados se pueden utilizar de inmediato para preparar los portaobjetos según el protocolo estándar del laboratorio o conservar en el frigorífico (2-8 °C) o congelador para su uso futuro.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

El CHANG Marrow debe conservarse congelado a menos de –10 °C hasta que esté listo para uso. Si se conserva congelado, el CHANG Marrow se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. Después de la descongelación, el producto sobrante no utilizado se puede dispensar en porciones alícuotas de trabajo y volver a congelar para su uso posterior o bien cerrar herméticamente y conservar a 2-8 °C durante 30 días como máximo. Proteger de la luz fluorescente.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Este producto lo debe utilizar personal con formación en procedimientos que incluyan el uso previsto del producto.

El CHANG Marrow contiene medio acondicionado con FBS y GCT y se debe manipular con las precauciones universales de laboratorio. El medio contiene un antibiótico (gentamicina) para reducir la posible contaminación bacteriana, pero siempre que se dispense el medio se utilizarán técnicas asépticas. No utilizar ningún medio que no sea de color rojo.

FRANÇAIS

INDICATION D'UTILISATION

CHANG Marrow est destiné à être utilisé pour la culture primaire des cellules cliniques de moelle osseuse humaine lors du caryotypage et des autres tests génétiques de troubles hématologiques.

DESCRIPTION DU DISPOSITIF

CHANG Marrow est un milieu prêt à l'emploi composé d'IMDM, contenant du SVF, un tampon d'HEPES, de la glutamine L, un milieu conditionné de tumeur à cellules géantes (TCG), du GM-CSF humain recombinant et du sulfate de gentamicine. CHANG Marrow a été optimisé pour favoriser la croissance efficace des cellules de moelle osseuse lors de l'analyse cytogénétique. La culture de la moelle osseuse ne nécessite l'ajout d'aucun composant. CHANG Marrow contient du sulfate de gentamicine (50 mg/l). D'autres antibiotiques peuvent également être ajoutés, le cas échéant.

COMPOSANTS

<u>Acides aminés</u>	<u>Sels et ions</u>	<u>Antibiotique</u>
Alanine	Chlorure	Sulfate de gentamicine
Arginine	de sodium	
Asparagine	Sélnite	
Acide aspartique	de sodium	
Cystine	Chlorure	
Acide glutamique	de calcium	
Glutamine	Chlorure	
Glycine	de choline	
Histidine	Chlorure	
Isoleucine	de potassium	
Leucine	Nitrate	
Lysine	de potassium	
Méthionine	Sulfate de magnésium	
Phénylalanine	Phosphate	
Proline	de sodium	
Sérine		
Thrénine		
Tryptophane	<u>Tampons</u>	
Tyrosine	Bicarbonate	
Valine	de sodium	
	HEPES	
<u>Protéines, hormones, et facteurs de croissance</u>	<u>Substrats énergétiques</u>	
Sérum de veau fœtal (SVF)	Glucose	
hrGM-CSF	Piruvate	
	Inositol	

ASSURANCE QUALITÉ

Plusieurs facteurs, y compris la source des échantillons, l'état des cultures et le choix des réactifs, peuvent influencer le résultat obtenu. Il est conseillé de traiter chaque nouveau lot de réactif parallèlement au matériel de référence présentant une activité appropriée connue avant de commencer à utiliser le milieu de façon régulière. Les performances de chaque lot de CHANG Marrow ont été testées sur des cultures cliniques de moelle osseuse dans un laboratoire indépendant de cytogénétique clinique, et comparées à celles d'un milieu témoin. Les résultats sont rapportés dans un certificat d'analyses spécifique à chaque lot.

MATÉRIAUX ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

1. Tubes pour centrifugeuse stériles et flacons de culture en plastique
2. Incubateur à CO₂ à 37 °C
3. Centrifugeuse de table
4. Vortex
5. Solution mère de Colcemid, 10 µg/ml
6. Solution de chlorure de potassium, 0,075 M
7. Solution de fixation, méthanol:acide acétique (3:1)

PRÉPARATION

Décongeler jusqu'au lendemain dans le réfrigérateur (entre 2 et 8 °C), puis mélanger délicatement pour garantir l'homogénéité. Répartir de façon aseptique 10 ml de milieu dans des flacons de culture stériles et équilibrer à 37 °C pour une utilisation immédiate.

MODE D'EMPLOI

I. Préparation des échantillons :

Utiliser 0,5 à 1,0 ml d'aspirat de moelle osseuse contenant de l'héparine sodique. L'héparine de lithium, l'EDTA ou les anticoagulants à base de citrate ne conviennent pas aux études cytogénétiques.

- Si plus de 5 ml d'aspirat de moelle osseuse sont prélevés, l'échantillon peut être hémodilué. Isoler la fraction de moelle osseuse de l'échantillon par centrifugation à 1 200 tr/min pendant 8 minutes.
- Si l'échantillon est livré dans un milieu de transport, isoler l'échantillon par centrifugation à 1 200 tr/min pendant 8 minutes et retirer le milieu de transport (surnageant). Inoculer à l'aide de la fraction résiduelle centrifugée au fond du tube.

Pour plus de détails sur l'utilisation de ces produits, chaque laboratoire doit consulter ses propres procédures et protocoles standard qui ont été spécialement élaborés et optimisés pour chaque établissement médical particulier.

II. Culture de moelle osseuse :

Étiqueter tous les flacons de culture avec le nom du patient, le numéro de l'échantillon et le type de culture.

1. Avant l'inoculation de l'échantillon, amener le CHANG Marrow à température ambiante.
2. Inoculer chaque culture avec la quantité appropriée d'échantillon pour obtenir une concentration optimale de 1 x 10⁴ cellules/ml ou 10 x 10⁶ cellules par 10 ml de culture.
3. Chaque laboratoire individuel doit déterminer le nombre de cultures à préparer en fonction de l'indication clinique du patient. D'autres facteurs de croissance peuvent également être ajoutés, le cas échéant.
4. Incuber les cultures entre 35 et 39 °C dans une atmosphère contenant entre 5 et 8 % de CO₂ jusqu'à ce qu'elles soient prêtes pour la collecte.

Collecte des cultures :

1. Retirer la culture prête pour la collecte de l'incubateur et agiter légèrement le flacon pour remettre les cellules en suspension.
2. Transférer le contenu de chaque flacon dans un tube à centrifuger de 15 ml.
3. Ajouter 40 µl de solution mère de Colcemid (10 µg/ml) à chaque tube de culture. Boucher hermétiquement les tubes et mélanger délicatement par retournement.
4. Incuber les tubes entre 35 et 39 °C pendant 45 minutes.
5. Après l'incubation, centrifuger les tubes pendant 8 minutes à 1 000 tr/min.
6. Aspirer délicatement le surnageant de chaque tube à l'aide d'un aspirateur à vide muni d'un piège à solvant. Veiller à ne pas aspirer le culot.
7. Remettre le culot de cellules en suspension en tapotant le fond ou le côté de chaque tube avec le doigt.
8. Lancer une minuterie de 20 minutes.
9. Ajouter 3 à 4 ml de solution hypotonique (0,075 M de chlorure de potassium) préchauffée (35 à 37 °C) en goutte à goutte.
10. Boucher hermétiquement le tube et mélanger délicatement en tapotant le fond ou le côté du tube avec le doigt.
11. Ajouter 5 à 6 ml de solution hypotonique préchauffée (35 à 37 °C) en goutte à goutte. Boucher hermétiquement le tube et le retourner.
12. Répéter les étapes 9 à 11 pour chaque tube.
13. Laisser les tubes reposar dans un bain-marie entre 35 et 37 °C. Retourner les tubes une fois au milieu de la minuterie de 20 minutes.

14. À la fin de la minuterie de 20 minutes, retirer les tubes du bain-marie et ajouter 1 ml de solution de fixation de Carnoy fraîche au 3:1 à chaque tube. Boucher hermétiquement et retourner chaque tube. (Il s'agit de l'étape de fixation préliminaire.)
15. Centrifuger les tubes pendant 8 minutes à 1 000 tr/min.
16. Aspirer le surnageant de chaque tube en laissant environ 1 ml au-dessus du culot de cellules. Veiller à ne pas aspirer le culot. Prendre garde au matériau fibreux qui peut s'étendre du culot de cellules jusque dans le surnageant après la centrifugation. Il peut être nécessaire de prélever les quelques derniers millilitres de surnageant manuellement à l'aide d'une pipette Pasteur (sans aspiration à vide) pour éviter d'aspirer l'ensemble du culot de cellules dans le récipient à déchets.
17. Remettre le culot de cellules en suspension, comme décrit à l'étape 7.
18. Ajouter 3 à 4 ml de solution de fixation de Carnoy fraîche au 3:1 en goutte à goutte.
19. Ajouter la solution de fixation restante jusqu'à 7 ml.
20. Répéter les étapes 16 à 19 pour chaque tube.
21. Laisser reposer pendant 10 minutes à température ambiante. (Il s'agit de la première étape de fixation.)
22. Centrifuger les tubes pendant 8 minutes à 1 000 tr/min.
23. Aspirer le surnageant en laissant environ 1 ml au-dessus du culot. Remettre le culot de cellules en suspension.
24. Ajouter la solution de fixation jusqu'à 7 ml. Centrifuger les tubes pendant 8 minutes à 1 000 tr/min. (Deuxième étape de fixation)
25. Répéter les étapes 22 à 23. (Troisième étape de fixation)
26. À ce stade, les culots de cellules fixées peuvent être utilisés immédiatement pour la préparation des lames conformément au protocole standard du laboratoire ou conservés au réfrigérateur (entre 2 et 8°C) ou au congélateur pour utilisation ultérieure.

CONSERVATION ET STABILITÉ

CHANG Marrow doit être conservé congelé à moins de -10 °C jusqu'à ce qu'il soit prêt à être utilisé. CHANG Marrow est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon lorsqu'il est conservé conformément aux instructions. Après la décongélation, tout produit non utilisé peut être réparti dans des aliquotes de travail et recongelé pour une utilisation ultérieure ou le flacon peut être bouché hermétiquement et conservé entre 2 et 8 °C pendant 30 jours maximum. Protéger de la lumière fluorescente.

PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE

Ce dispositif est destiné à une utilisation par un personnel formé aux techniques comprenant l'application indiquée pour laquelle le dispositif est prévu.

CHANG Marrow contient du SVF et un milieu conditionné de TCG et doit être manipulé en utilisant les précautions d'usage universelles. Le milieu contient un antibiotique (sulfate de gentamicine) pour réduire le risque de contamination bactérienne, mais des techniques aseptiques doivent toujours être utilisées lors de sa répartition. Ne pas utiliser le milieu s'il n'est pas de couleur rouge.

PORTUGUÊS

INDICAÇÃO DE UTILIZAÇÃO

O CHANG Marrow destina-se a ser utilizado em cultura primária de culturas clínicas de medula óssea humana para cariotipagem e outros testes genéticos de várias doenças hematológicas.

DESCRIÇÃO DO DISPOSITIVO

O CHANG Marrow é um meio pronto a utilizar constituído por IMDM, com FBS, tampão HEPES, L-glutamina, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium, Recombinant Human GM-CSF e sulfato de gentamicina. O CHANG Marrow foi otimizado de modo a suportar o crescimento e diferenciação de células da medula óssea para análise citogenética. Sem adição de quaisquer componentes antes de a cultura de medula óssea ser necessária. O CHANG Marrow contém sulfato de gentamicina (50 mg/l). Se pretender, pode adicionar mais antibióticos.

COMPONENTES

<i>Aminoácidos</i>	<i>Proteínas, hormonas e fatores</i>	<i>Antibiótico</i>
Alanina	<i>de crescimento</i>	Sulfato de gentamicina
Arginina	Soro bovino fetal (FBS)	<i>Outro</i>
Asparagina	hrGM-CSF	Biotina
Ácido aspártico		Giant cell tumor
Cistina		conditioned medium
Ácido glutâmico		(GCT-CM)
Glutamina	<i>Sais e iões</i>	
Glicina	Cloreto de sódio	
Histidina	Selenito de sódio	
Isoleucina	Cloreto de cálcio	<i>Vitaminas</i>
Leucina	Cloreto de colina	e <i>oligoelementos</i>
Lisina	Cloreto de potássio	Ácido fólico
Metionina	Nitrato de potássio	Nicotinamida
Fenilalanina	Sulfato de magnésio	Riboflavina
Prolina	Fosfato de sódio	Tiamina
Serina		Ácido pantoténico
Treonina	<i>Tampões</i>	Cobalamina
Triptofano	Bicarbonato de sódio	Pyridoxina
Tirosina	HEPES	<i>Água</i>
Valina		Qualidade WFI
	<i>Substratos energéticos</i>	(água p/preparações injetáveis)
	Glucose	
	Pruvato	
	Inositol	

GARANTIA DE QUALIDADE

O resultado obtido pode ser influenciado por vários fatores que incluem a origem dos espécimes, as condições de cultura e a seleção dos reagentes. Antes da adoção em utilização de rotina, os utilizadores são aconselhados a analisar cada novo lote de reagente em paralelo com material de referência de atividade adequada conhecida. O desempenho de cada lote de CHANG Marrow foi testado em culturas clínicas de medula óssea num laboratório de citogenética clínica por comparação com um meio de controlo. Os resultados estão descritos no certificado de análise específico de cada lote.

MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Tubos de centrífugadora estéreis de plástico e frascos de cultura
- Incubadora de CO₂ a 37 °C
- Centrífugadora de bancada
- Misturador de vórtice
- Colcemid Stock Solution, 10 µg/ml
- Solução de cloreto de potássio, 0,075 M
- Solução de fixação, metanol:ácido acético (3:1)

PREPARAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO

Descongele no frigorífico (2 °C–8 °C), durante a noite, e depois misture suavemente para assegurar a homogeneidade. Dispense assepticamente 10 ml de meio em frascos de cultura estéreis e deixe atingir os 37 °C para utilização imediata.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

I. Preparação da amostra:

Utilize 0,5 ml a 1,0 ml de aspirado de medula óssea com heparina de sódio. Os anticoagulantes heparina de lítio, EDTA ou citratos não são adequados para estudos citogenéticos.

- Caso se receba mais de 5 ml de aspirado de medula óssea, a amostra pode ficar hemodiluída. Centrífugue o espécime a 1200 rpm durante 8 minutos, para isolar a fração da medula óssea.
- Se o espécime chegar em meio de transporte, centrifugue a 1200 rpm durante 8 minutos e retire o meio de transporte (sobrenadante). Inocule, utilizando a fração centrifugada restante no fundo do tubo.

Para obter mais informações sobre a utilização destes produtos, cada laboratório deve consultar os respetivos procedimentos e protocolos que tenham sido concebidos e otimizados especificamente para o seu programa médico.

II. Cultura de medula óssea:

Identifique todos os recipientes de cultura com o nome do doente, o número de espécime e o tipo de cultura.

- Antes de proceder à inoculação do espécime, deixe o CHANG Marrow atingir a temperatura ambiente.
- Inocule cada cultura com a quantidade adequada de amostra para obter uma concentração ideal de 1x10⁶ células/ml ou 10 x 10⁶ células por 10 ml de cultura.
- Cada laboratório deve determinar o número de culturas a preparar dependendo da indicação clínica do doente. Se pretender, pode adicionar mais fatores de crescimento.
- Incube as culturas a 35 °C–39 °C, numa atmosfera de 5%–8% de CO₂ até estarem prontas para colheita.

Colheita de culturas:

- Remova a cultura pronta para colheita da incubadora e gire suavemente o frasco para ressuspender as células.
- Transfira o conteúdo de cada frasco de cultura para um tubo de centrífugadora de 15 ml.
- Adicione 40 µl de solução de stock Colcemid (10 µg/ml) a cada tubo de cultura. Tape bem os tubos e misture suavemente, invertendo-os.
- Incube os tubos a 35 °C–39 °C durante 45 minutos.
- Após a incubação, centrifugue os tubos durante 8 minutos a 1000 rpm.
- Aspire cuidadosamente o sobrenadante de cada tubo, utilizando um aspirador com vácuo e coletor de solvente. Tenha cuidado para não aspirar o *pellet*.
- Ressuspenda o *pellet*, batendo na parte inferior ou na parte lateral de cada tubo com um dedo.
- Inicie um período de 20 minutos no temporizador.
- Adicione 3–4 ml, gota a gota, de solução hipotónica pré-aquecida (35 °C–37 °C) (cloreto de potássio 0,075 M).
- Tape bem o tubo e misture suavemente, batendo na parte inferior ou na parte lateral do tubo com um dedo.
- Adicione 5–6 ml, gota a gota, de solução hipotónica pré-aquecida (35 °C–37 °C). Tape bem o tubo e inverta-o.
- Repita os passos 9 a 11 para cada tubo.

- Deixe os tubos atingirem uma temperatura de 35 °C–37 °C em banho-maria. Inverta os tubos depois de decorrida metade dos 20 minutos do temporizador.

- Quando terminar o período de 20 minutos, remova os tubos do banho-maria e adicione 1 ml de fixador de Carnoy recém-preparado, numa proporção de 3:1, a cada tubo. Tape bem o tubo e inverta cada um dos tubos. (Esta é a etapa de pré-fixação)

- Centrifugue os tubos durante 8 minutos a 1000 rpm.
- Aspire o sobrenadante de cada tubo, deixando cerca de 1 ml acima do *pellet* de células. Tenha cuidado para não aspirar o *pellet*. Tenha atenção ao material fibroso que pode estender-se a partir do *pellet* de células para cima, para o interior do sobrenadante após a centrifugação. Os últimos mililitros de sobrenadante podem ter de ser removidos à mão com uma pipeta de Pasteur (não utilizar aspiração com vácuo) para evitar aspirar todo o *pellet* de células para o recipiente de resíduos.
- Ressuspenda o *pellet* de células, tal como descrito no passo 7.

- Adicione 3–4 ml, gota a gota, de fixador de Carnoy recém-preparado, numa proporção de 3:1.
- Adicione o restante fixador de modo que o volume total perfaça 7 ml.

- Repita os passos 16 a 19 para cada tubo.

- Deixe repousar à temperatura ambiente durante 10 minutos. (Esta é a primeira etapa de fixação)
- Centrifugue os tubos durante 8 minutos a 1000 rpm.
- Aspire o sobrenadante, deixando cerca de 1 ml acima do *pellet*. Ressuspenda o *pellet* de células.
- Adicione o fixador até o volume total perfazer 7 ml. Centrifugue os tubos durante 8 minutos a 1000 rpm. (Segunda etapa de fixação)
- Repita os passos 22 a 23. (Terceira etapa de fixação)

- Neste ponto, os *pellets* de células fixadas podem ser utilizados imediatamente para a preparação de lâminas de acordo com o protocolo padrão do laboratório, ou conservados no frigorífico (2 °C–8 °C) ou no congelador para utilização futura.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

O CHANG Marrow deve ser conservado congelado a uma temperatura inferior a –10 °C até estar pronto a utilizar. O CHANG Marrow é estável até ao prazo de validade indicado no rótulo do frasco, desde que conservado congelado. Após a descongelação, qualquer produto não usado pode ser dividido em alíquotas de trabalho e recongelado para utilização posterior, ou bem tapado e conservado entre 2 °C e 8 °C durante um período de até 30 dias. Proteger da luz fluorescente.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

Este dispositivo destina-se a ser utilizado por pessoal com formação em técnicas que incluem a aplicação indicada à qual se destina o dispositivo.

O CHANG Marrow contém meio condicionado com FBS e GCT e deve ser manipulado utilizando as precauções laboratoriais universais. O meio contém um antibiótico (sulfato de gentamicina) para reduzir o potencial de contaminação bacteriana; contudo, ao dispensar o meio, devem ser sempre utilizadas técnicas assépticas. Não utilize qualquer meio que não tenha cor vermelha.

ΕΛΛΗΝΙΚΑ

ΕΝΔΕΙΞΗ ΧΡΗΣΗΣ

Το CHANG Marrow προορίζεται για χρήση στην πρωτογενή καλλιέργεια κλινικών καλλιεργείων ανθρώπινου μυελού των οστών για καρυοτυποποίηση και άλλες γενετικές εξετάσεις για διάφορες αιματολογικές διαταραχές.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ

Το CHANG Marrow είναι ένα έτοιμο για χρήση μέσο που αποτελείται από IMDM, με FBS, ρυθμιστικό διάλυμα HEPES, L-γλουταμίνη, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium, ανασυνδυασμένο ανθρώπινο GM-CSF και θεική γενταμικίνη. Το CHANG Marrow έχει βελτιστοποιηθεί για την υποστήριξη της αποτελεσματικής ανάπτυξης κυττάρων μυελού των οστών για καρυογενετική ανάλυση. Δεν απαιτείται προσθήκη οποιουδήποτε συστατικού πριν από την καλλιέργεια του μυελού των οστών. Το CHANG Marrow περιέχει θεική γενταμικίνη (50 mg/L). Μπορείτε να προσθέσετε συμπληρωματικά αντιβιοτικά αν το επιθυμείτε.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

<i>Αμινοξέα</i>	<i>Πρωτεΐνες, ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες</i>	<i>Ενεργειακά υποστρώματα</i>
Αλανίνη	Ορός από έμβryo βοοειδών (FBS)	Γλυκόζη
Αργινίνη	hrGM-CSF	Πυροσφαλικό ινοσιτόλη
Ασπαργίνη		<i>Αντιβιοτικό</i>
Ασπαρτικό οξύ		Θεική γενταμικίνη
Κυστίνη		
Γλουταμικό οξύ	<i>Άλατα και ιόντα</i>	Θεική γενταμικίνη
Γλουταμίνη	Χλωριούχο νάτριο	
Γλυκίνη	Σεληνικό νάτριο	<i>Άλλα</i>
Ιστιδίνη	Χλωριούχο ασβέστιο	Βιτίνη
Ισολευκίνη	Χλωριούχος χολίνη	Giant cell tumor
Λευκίνη	Χλωριούχος κάλιο	conditioned medium
Λυσίνη	Νιτρικό κάλιο	(GCT-CM)
Μεθειονίνη	Θεϊκό μαγνήσιο	
Φαινυλαλανίνη	Φωσφορικό νάτριο	<i>Βιταμίνες και ιννοστατικά</i>
Προλίνη		Φυλλικό οξύ
Σερίνη		Νικοτιναμίδη
Θρεονίνη	<i>Ρυθμιστικά διαλύματα</i>	Ριβοφλαβίνη
Τρυπτοφάνη	Διττανθρακικό νάτριο	Θεαίνη
Τυροσίνη	HEPES	Παντοθενικό οξύ
Βαλίνη		Κοβαλαμίνη
		Πυριδοξίνη

<i>Νερό</i>
Ποιότητα ενέσιμου υδάτος (WFI)

ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Το αποτέλεσμα που λαμβάνεται μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως η προέλευση των δειγμάτων, οι συνθήκες καλλιέργειας και η επιλογή αντιδραστηρίων. Προτείνεται οι χρήστες να αναλύουν κάθε νέα παρτίδα αντιδραστηρίων παράλληλα με υλικό αναφοράς γνωστής, κατάλληλης δραστικότητας, πριν από την υιοθέτηση σε χρήση ρουτίνας. Κάθε παρτίδα CHANG Marrow έχει ελεγχθεί για την απόδοση της σε κλινικές καλλιέργειες μυελού των οστών σε ανεξάρτητο εργαστήριο κλινικής κυτταρογενετικής σε σύγκριση με ένα μέσο ελέγχου. Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε Πιστοποιητικό Ανάλυσης ειδικό ανά παρτίδα.

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Πλαστικά, αποστειρωμένα σωληνάρια φυγόκεντρου και μπουκαλίκια καλλιέργειας
- Επωαστήρας CO₂ στους 37 °C
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος
- Αναμίκτης στροβιλισμού
- Αποθεματικό διάλυμα κολσεμίδης, 10 µg/mL
- Διάλυμα χλωριούχου καλίου, 0,075 M
- Διάλυμα μονιμοποίησης, μεθανόλη:οξικό οξύ (3:1)

ΠΡΟΕΤΙΜΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ

Αποψύξτε κατά τη διάρκεια της νύχτας στο ψυγείο (2 - 8 °C) και στη συνέχεια αναμίξτε ήπια, ώστε να διασφαλίζεται η ομογενείά του. Διανείμετε με δάπτης συνθήκες 10 mL μέσου σε αποστειρωμένα μπουκαλίκια καλλιέργειας και ισορροπήστε στους 37 °C για άμεση χρήση.

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

I. Προετοιμασία δειγμάτων:

Χρησιμοποιήστε 0,5 έως 1,0 mL υλικού αναρρόφησης μυελού των οστών με ηπαρινισμένο νάτριο. Η ηπαρίνη λήθιο, το EDTA ή τα κηρικά αντιπηκτικά είναι ακατάλληλα για κυτταρογενετικές μελέτες.

- Εάν ληφθούν περισσότερα από 5 mL του υλικού αναρρόφησης του μυελού των οστών, το δείγμα μπορεί να είναι αραιωμένο με αίμα. Φυγοκεντρίστε το δείγμα στις 1.200 σ.α.λ. για 8 λεπτά, για να απομονώσετε το δείγμα του μυελού των οστών.
- Εάν το δείγμα παραληφθεί σε μέσο μεταφοράς, φυγοκεντρίστε το δείγμα στις 1.200 σ.α.λ. για 8 λεπτά και αφαιρέστε το μέσο μεταφοράς (υπερκείμενο). Ενοφθαλμίστε χρησιμοποιώντας το υπόλοιπο φυγοκεντρισμένο κλάσμα που υπάρχει στο κάτω μέρος του σωληναρίου.

Για πρόσθετες λεπτομέρειες σχετικά με τη χρήση των προϊόντων αυτών, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να συμβουλευτείται τις δικές του εργαστηριακές διαδικασίες και πρωτόκολλα, τα οποία έχουν αναπτυχθεί και βελτιστοποιηθεί ειδικά για το δικό το ιατρικό πρόγραμμα.

II. Καλλιέργεια μυελού των οστών:

Επισημάνετε όλα τα δοχεία καλλιέργειας με το όνομα του ασθενούς, τον αριθμό δείγματος και τον τύπο της καλλιέργειας.

- Πριν από τον ενοφθαλμισμό του δείγματος, φέρτε το CHANG Marrow σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Ενοφθαλμίστε κάθε καλλιέργεια με την κατάλληλη ποσότητα δείγματος, για να επιτύχετε τη βέλτιστη συγκέντρωση 1 x 10⁶ κυττάρων/mL ή 10 x 10⁶ κυττάρων ανά 10 mL καλλιέργειας.
- Κάθε μεμονωμένο εργαστήριο θα πρέπει να προσδιορίσει τον αριθμό των καλλιεργείων που θα παρασκευάσει, ανάλογα με την κλινική ένδειξη του ασθενούς. Μπορείτε να προσθέσετε πρόσθετους αυξητικούς παράγοντες αν το επιθυμείτε.
- Επώαστε τις καλλιέργειες στους 35 - 39 °C, σε ατμόσφαιρα 5 - 8% CO₂, έως ότου είναι έτοιμες για συλλογή.

Συλλογή καλλιεργείων:

- Αφαιρέστε την καλλιέργεια που είναι έτοιμη για συλλογή από τον επωαστήρα και περιδίνετε το μπουκαλάκι με ήπιες κινήσεις, ώστε να επαναληφθεί η εναιώρηση των κυττάρων.
- Μεταφέρετε το περιεχόμενο που έχει κάθε μπουκαλάκι σε σωληνάριο φυγόκεντρου των 15 mL.
- Προσθέστε 40 µL αποθεματικού διαλύματος κολσεμίδης (10 µg/mL) σε κάθε σωληνάριο καλλιέργειας. Πωματίστε σφικτά τα σωληνάρια και αναμίξτε με ήπιες κινήσεις, με αναστροφή.
- Επώαστε τα σωληνάρια στους 35 - 39 °C για 45 λεπτά.
- Μετά την επώαση, φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια για 8 λεπτά στις 1.000 σ.α.λ.
- Αναρροφήστε προσεκτικά το υπερκείμενο από κάθε σωληνάριο χρησιμοποιώντας αναρρόφηση κενού με παγίδα διαλύτ. Προσέξτε να μην αναρροφήσετε το συσσωμάτωμα.

- Επαναλάβετε την εναιώρηση του κυτταρικού συσσωματώματος κτυπώντας ελαφρά με το δάκτυλο τον πυθμένα ή το πλαϊνό τοίχωμα κάθε σωληναρίου.

- Ξεκινήστε χρονομέτρηση 20 λεπτών.

- Προσθέστε με μορφή σταγόνων 3 - 4 mL προθερμασμένο (στους 35- 37 °C), υποτονικού διαλύματος (0,075 M χλωριούχου καλίου).
- Πωματίστε σφικτά το σωληνάριο και αναμίξτε με ήπιες κινήσεις, κτυπώντας ελαφρά με το δάκτυλο τον πυθμένα ή το πλαϊνό τοίχωμα του σωληναρίου.
- Προσθέστε με μορφή σταγόνων 5 - 6 mL προθερμασμένο (στους 35- 37 °C), υποτονικού διαλύματος. Πωματίστε σφικτά το σωληνάριο και αναστρέψτε το σωληνάριο.
- Επαναλάβετε τα βήματα 9 - 11 για κάθε σωληνάριο.

- Χρησιμοποιώντας υδατόλουτρο, αφήστε τα σωληνάρια να έρθουν σε θερμοκρασία 35 - 37 °C. Αναστρέψτε μία φορά τα σωληνάρια στο μέσο της χρονομέτρησης 20 λεπτών.

- Στο τέλος της χρονομέτρησης 20 λεπτών, αφαιρέστε τα σωληνάρια από το υδατόλουτρο και προσθέστε σε κάθε σωληνάριο 1 mL πρόσφατα παρασκευασμένου μέσου μονιμοποίησης Carnoy σε αναλογία 3:1. Πωματίστε σφικτά και αναστρέψτε κάθε σωληνάριο. (Αυτό είναι το βήμα πριν από τη μονιμοποίηση)

- Φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια για 8 λεπτά στις 1.000 σ.α.λ.

- Αναρροφήστε το υπερκείμενο από κάθε σωληνάριο, αφήνοντας περίπου 1 mL πάνω από το κυτταρικό συσσωμάτωμα. Προσέξτε να μην αναρροφήσετε το συσσωμάτωμα. Προσέξτε το ινώδες υλικό που μπορεί να επεκταθεί από το κυτταρικό συσσωμάτωμα προς τα πάνω και μέσα στο υπερκείμενο υγρό μετά τη φυγοκέντρωση. Τα τελευταία λίγα mL του υπερκ-έκμενου υγρού μπορεί να πρέπει να αφαιρεθούν χειρωνακτικά με πιπέτα Παστέρ (χωρίς να χρησιμοποιηθεί αναρρόφηση κενού) για να αποφευχθεί η αναρρόφηση ολόκληρου του κυτταρικού συσσωματώματος στον κάτω απορριμμάτων.

- Επαναλάβετε την εναιώρηση του κυτταρικού συσσωματώματος, όπως περιγράφεται στο βήμα 7.

- Προσθέστε με μορφή σταγόνων 3 - 4 mL πρόσφατα παρασκευασμένου μέσου μονιμοποίησης Carnoy σε αναλογία 3:1.

- Προσθέστε το υπόλοιπο μέσο μονιμοποίησης έως τα 7 mL.

- Επαναλάβετε τα βήματα 16 - 19 για κάθε σωληνάριο.

- Αφήστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. (Αυτό είναι το πρώτο βήμα της μονιμοποίησης).

- Φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια για 8 λεπτά στις 1.000 σ.α.λ.

- Αναρροφήστε το υπερκείμενο αφήνοντας περίπου 1 mL πάνω από το συσσωμάτωμα. Επαναλάβετε την εναιώρηση του κυτταρικού συσσωματώματος.

- Προσθέστε μέσο μονιμοποίησης έως τα 7 mL. Φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια για 8 λεπτά στις 1.000 σ.α.λ. (Δεύτερο βήμα μονιμοποίησης).

- Επαναλάβετε τα βήματα 22 - 23. (Τρίτο βήμα μονιμοποίησης).

- Σε αυτό το σημείο, τα μονιμοποιημένα κυτταρικά συσσωματώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμέσως για την προετοιμασία αντιικενομοφώρων πλακών, σύμφωνα με το τυπικό πρωτόκολλο του εργαστηρίου ή να φυλαχθούν στο ψυγείο (σε θερμοκρασία 2 - 8 °C) ή στον καταψύκτη για μελλοντική χρήση.

ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Το CHANG Marrow θα πρέπει να φυλάσσεται κατεψυγμένο, κάτω από τους -10 °C, μέχρι να είστε έτοιμοι να το χρησιμοποιήσετε. Το CHANG Marrow είναι σταθερό έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα της φιάλης, όταν φυλάσσεται κατεψυγμένο. Μετά την απόψυξη, τυχόν μη χρησιμοποιημένο προϊόν μπορεί να διανεμηθεί σε κλάσματα εργασίας και να επανασταψυχθεί για επακόλουθη χρήση ή να πετακαστεί σφικτά και να φυλαγθεί στους 2 - 8 °C, για έως και 30 ημέρες. Προστατέψτε το από φθορίζον φως.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Η συσκευή αυτή προορίζεται για χρήση από προσωπικό που έχει εκπαιδευτεί σε διαδικασίες που περιλαμβάνουν την υποδεικνυόμενη εφαρμογή για την οποία προορίζεται η συσκευή.

Το CHANG Marrow περιέχει FBS και GCT conditioned medium και ο χειρισμός του θα πρέπει να γίνεται με τη λήψη των γενικών εργαστηριακών προφυλάξεων. Το μέσο περιέχει ένα αντιβιοτικό (θεϊκή γενταμικίνη) για τη μείωση της πιθανότητας βακτηριακής μόλυνσης, αλλά θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πάντοτε δάπτης τεχνικές κατά τη διανομή του μέσου. Μη χρησιμοποιείτε κανένα μέσο που δεν έχει κόκκινο χρώμα.

ČEŠTINA

INDIKACE PRO POUŽITÍ

Médium CHANG Marrow je určeno k použití při primokultivaci klinických kultur lidské kostní dřeně ke karyotypizaci a jiným genetickým testům na různé hematologické poruchy.

POPIS PROSTŘEDKU

CHANG Marrow je médium připravené k použití, které se skládá z IMDM s FBS, puřem HEPES, L-glutaminem, kondicionáým médiem Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium, rekombinantním lidským GM-CSF a gentamicin-sulfátem. CHANG Marrow bylo optimalizováno na podporu efektivního růstu buněk kostní dřeně k cytogenetické analýze. Před kultivaci kostní dřeně není nutné přidávat žádné složky. CHANG Marrow obsahuje gentamicin-sulfát (50 mg/l). Pokud potřeby lze přidat další antibiotika.

SLOŽKY

Aminokyseliny	Proteiny, hormony a růstové faktory	Antibiotikum
Alanin	Fetální bovinní sérum (FBS)	Gentamicin-sulfát
Arginin	Ostatní	
Asparagin	hrGM-CSF	Biotin
Kyselina asparagová		Kondiciované médium Giant Cell Tumor Conditioned Medium (GCT-CM)
Cystin	<u>Soli a iony</u>	<u>Vitaminy a stopové prvky</u>
Kyselina glutamová	Chlorid sodný	Kyselina listová
Glutamin	Seleničitan sodný	Nikotinamid
Glycin	Cholinchlorid	Riboflavin
Histidin	Chlorid draselný	Thiamin
Isoleucin	Dusičan draselný	Kyselina
Leucin	Síran hořečnatý	pantothenová
Lysin	Fosforečnan sodný	sodný
Methionin		Kobalamin
Fenylalanin	<u>Puřy</u>	Pyridoxin
Prolin	Hydrogenuhlíčenat sodný	
Serin	HEPES	
Theonin		
Tryptofan	<u>Energetické substráty</u>	<u>Voda</u>
Tyrosin	Glukóza	V kvalitě vody pro injekci
Valin	Pyruvát	
	Inositol	

ZAJIŠTĚNÍ KVALITY

Dosažené výsledky může ovlivnit několik faktorů včetně zdroje vzorků, podmínek kultivace a výběru reagencií. Doporučujeme uživatelům, aby každou novou šarži reagencie před přijetím k rutinnímu používání zpracovávali paralelně s referenčním materiálem o známé odpovídající aktivitě. Účinnost každé šarže média CHANG Marrow byla otestována na klinických kulturách kostní dřeně nezávislou klinickou cytogenetickou laboratoří v porovnání s kontrolním médiem. Výsledky jsou uvedeny v analytickém certifikátu k příslušné šarži.

POTŘEBNÉ NEDODÁVANÉ MATERIÁLY A VYBAVENÍ

- Plastové sterilní centrifugační zkumavky a kultivační lahve
- CO₂ inkubátor na 37 °C
- Stolní centrifuga
- Třepačka vortex
- Zásobní roztok Colcemid, 10 µg/ml
- Roztok chloridu draselného, 0,075 M
- Fixační roztok methanol : kyselina octová (3 : 1)

PŘÍPRAVA K POUŽITÍ

Rozmrzate přes noc v chladničce (2–8 °C) a potom jemným promícháním zajistíte homogenitu. Asepticky nadávkujte 10 ml média do sterilních kultivačních lahví a ekvilibrujte na 37 °C k okamžitému použití.

NÁVOD K POUŽITÍ

I. Příprava vzorku:

Použijte 0,5 až 1,0 ml aspirátu kostní dřeně s heparinem sodným. Heparin lithný, EDTA ani citrátová anti-koagulantia nejsou pro cytogenetická vyšetření vhodná.

- Pokud dostanete více než 5 ml aspirátu kostní dřeně, mohlo dojít k hemodiluci vzorku. Odstředěním při 1 200 ot./min po dobu 8 minut izolujte frakci kostní dřeně vzorku.
- Pokud vzorek dostanete v transportním médiu, odstředějte ho při 1 200 ot./min po dobu 8 minut a odstraňte transportní médium (supernatant). Inokulujte při použití odstředěné frakce zbývající v dolní části zkumavky.

Další informace o použití těchto výrobků každá laboratoř získá ve vlastních laboratorních metodách a protokolech vypracovaných a optimalizovaných specificky pro její konkrétní zdravotnický program.

II. Kultivace kostní dřeně:

Všechny kultivační nádoby označte jménem pacienta, číslem vzorku a typem kultury.

- Před inokulací vzorkem nechte CHANG Marrow dosáhnout teploty prostředí.
- Inokulujte každou kulturu příslušným objemem vzorku tak, aby bylo dosaženo optimální koncentrace 1 x 10⁶ buněk/ml neboli 10 x 10⁶ buněk na 10 ml kulturu.
- Každá laboratoř si podle klinické indikace pacienta stanoví počet kultur, které je třeba připravit. Podle potřeby lze přidat další růstové faktory.
- Kultury inkubujte při teplotě 35–39 °C v atmosféře s 5–8 % CO₂, dokud nebudou připraveny ke sběru.

Sběr kultur:

- Vyjměte kulturu připravenou ke sběru z inkubátoru a jemným zakroužením lahvi resuspendujte buňky.
- Přeneste obsah každé lahve do 15ml centrifugační zkumavky.
- Do každé kultivační zkumavky přidejte 40 µl zásobního roztoku Colcemid (10 µg/ml). Zkumavky těsně zazátkujte a převracením jemně promíchejte.
- Inkubujte zkumavky 45 minut při teplotě 35–39 °C.
- Po inkubaci zkumavky odstředte po dobu 8 minut na 1 000 ot./min.
- Opatrně z každé zkumavky aspirujte supernatant; použijte podtlakový aspirátor s odlučovačem rozpouštědla. Dbejte, abyste neaspirovali pelet.
- Poklepáním na stěnu nebo do zkumavky prstem buněčný pelet resuspendujte.
- Spustte časovač na 20 minut.
- Po kapkách přidejte 3–4 ml předehřátého (35–37 °C) hypotonického roztoku (0,075 M chloridu draselného).
- Zkumavku těsně zazátkujte a poklepáním prstem na stěnu nebo dno jemně promíchejte.
- Po kapkách přidejte 5–6 ml předehřátého (35–37 °C) hypotonického roztoku. Zkumavku těsně zazátkujte a převratte.
- Opakujte kroky 9–11 u každé zkumavky.
- Nechte zkumavky odstát při 35–37 °C ve vodní lázni. V polovině 20 minut měřených časovačem zkumavky jednou převratte.
- Až časovač odměří 20 minut, vyjměte zkumavky z vodní lázně a přidejte do každé zkumavky 1 ml čerstvého Carnoyova fixačního roztoku (3 : 1). Každou zkumavku těsně zazátkujte a převratte. (Toto je předfixační krok.)
- Odstředějte zkumavky po dobu 8 minut při 1 000 ot./min.

- Z každé zkumavky aspirujte supernatant; ponechte přítom známě 1 ml nad buněčným peletem. Dbejte, abyste neaspirovali pelet. Věnujte pozornost vláknitému materiálu, který po centrifugaci může z peletu zasahovat do supernatantu. Posledních několik ml supernatantu může být nutně odstranit ručně Pasteurovou pipetou (nikoli podtlakovou aspirací), abyste zabránili nasátí celého buněčného peletu do odpadní nádoby.
- Resuspendujte buněčný pelet podle popisu v kroku 7.
- Po kapkách přidejte 3–4 ml čerstvého Carnoyova fixačního roztoku (3 : 1).
- Doplňte zbývajícím fixačním roztokem do 7 ml.
- Opakujte kroky 16–19 u každé zkumavky.
- Nechte 10 minut odstát při pokojové teplotě. (Toto je první fixační krok.)
- Odstředějte zkumavky po dobu 8 minut při 1 000 ot./min.
- Aspirujte supernatant; ponechte přibližně 1 ml nad buněčným peletem. Resuspendujte buněčný pelet.
- Doplňte fixačním roztokem do 7 ml. Odstředějte zkumavky po dobu 8 minut při 1 000 ot./min. (Druhý fixační krok.)
- Opakujte kroky 22–23. (Třetí fixační krok.)
- V této chvíli lze fixované buněčné pelety ihned použít k přípravě sklíček podle standardního protokolu laboratoře nebo uložit do chladničky (2–8 °C) či mrazničky k budoucímu použití.

UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

CHANG Marrow je třeba do použití uchovávat zmrazené při teplotě nižší než –10 °C. Pokud je skladováno zmrazené, CHANG Marrow je stabilní do data expirace uvedeného na štítku lahve. Po rozmrazení lze všechny nespotřebovaný výrobek rozdělit na díly používané při zpracování a znovu zmrazit k pozdějšímu použití nebo pevně uzavřít a skladovat po dobu až 30 dní při teplotě 2–8 °C. Chraňte před fluorescenčním světlem.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A VAROVÁNÍ

Tento prostředek je určen k použití pracovníky školenými v postupech, které zahrnují indikovanou aplikaci, pro kterou je prostředek určený.

CHANG Marrow obsahuje FBS a kondiciované médium GCT a je třeba s ním zacházet při dodržení všeobecných laboratorních bezpečnostních opatření. Médium obsahuje k omezení potenciálu bakteriální kontaminace antibiotikum (gentamicin-sulfát), ale při dávkování média je vždy třeba používat aseptické techniky. Nepoužívejte žádné médium, které nemá červenou barvu.

DANSK

INDIKATIONER FOR ANVENDELSE

CHANG Marrow er beregnet til anvendelse ved primær dyrkning af kliniske humane knoglemarvskulturer til karyotypebestemmelse og anden genetisk testing af forskellige hæmatologiske lidelser.

BESKRIVELSE AF PRODUKTET

CHANG Marrow er et brugsklart medium, der består af IMDM med FBS, HEPES-buffer, L-glutamin, kæmpecelletumor (Giant Cell Tumor, GCT) konditioneret medium, rekombinant human GM-CSF og gentamicin-sulfat. CHANG Marrow er optimeret til at støtte effektiv vækst af knoglemarvsceller til cytogenetisk analyse. Det er ikke nødvendigt at tilsætte andre komponenter inden dyrkning af knoglemarven. CHANG Marrow indeholder gentamicinsulfat (50 mg/l). Der kan eventuelt tilsættes ekstra antibiotika.

KOMPONENTER

Aminosyrer	Proteiner, hormoner og vækstfaktorer	Antibiotikum
Alanin	Fetalt bovint serum (FBS)	Gentamicinsulfat
Arginin	Andet	
Asparagin	Biotin	
Asparaginsyre	Kæmpecelletumor	
Cystin	konditioneret medium	
Glutaminsyre	(Giant cell tumor conditioned medium, GCT-CM)	
Glutamin	<u>Salte og ioner</u>	<u>Vitaminer og sporelementer</u>
Glycin	Natriumklorid	Folsyre
Histidin	Natriumselenit	Nicotinamid
Isoleucin	Kalciumklorid	Riboflavin
Leucin	Kolinklorid	Thiamin
Lysin	Kaliumklorid	Pantothenysyre
Methionin	Kaliumnitrat	Cobalamin
Phenylalanin	Magnesiumsulfat	Pyridoxin
Prolin	Natriumfostat	
Serin		
Threonin	<u>Buffere</u>	<u>Vand</u>
Tryptofan	Natriumbikarbonat	Af kvalitet til injektionsvæske
Tyrosin	HEPES	
Valin	<u>Energisubstrater</u>	<u>Vand</u>
	Glukose	Af kvalitet til injektionsvæske
	Pyruvat	
	Inositol	

KVALITETSSIKRING

Flere faktorer, herunder prøvernes kilde, kulturens tilstand og valg af reagenser, kan have indflydelse på de opnåede resultater. Brugere rådes til at køre hvert nyt reagensbatch parallelt med referencemateriale, der vides at have passende aktivitet, inden rutine-anvendelse. Hvert parti CHANG Marrow er blevet ydeevnetestet på kliniske knoglemarvskulturer på et uafhængigt klinisk cytogenetisk laboratorium og sammenlignet med et kontrolmedium. Resultaterne rapporteres på et partispecifikt analysecertifikat.

NØDVENDIGE MATERIALER OG USTYR, DER IKKE MEDFØLGER

- Sterile centrifugerer og dyrkningskolber af plastic
- CO₂-inkubator ved 37 °C
- Bordcentrifuge
- Vortexmixer
- Colcemid-stamopløsning, 10 µg/ml
- Kaliumkloridopløsning, 0,075 M
- Fikseringsopløsning, methanol:eddikesyre (3:1)

KLARGØRING

Optå natten over i køleskab (2-8°C), bland derefter forsigtigt for at sikre homogenitet. Dispenser 10 ml af mediet aseptisk ind i sterile dyrkningskolber, og ækvilibrer til 37 °C til øjeblikkelig anvendelse.

BRUGSANVISNING

1. Prøveforberedelse:

Anvend 0,5 til 1,0 ml natriumhepariniseret knoglemarvsaspirat. Lithiumheparin, EDTA eller citrat-antikoagulanter er ikke velegnede til cytogenetiske undersøgelser.

- Hvis der modtages mere end 5 ml knoglemarvsaspirat, kan prøven være blandet med blod. Centrifuger prøven ned ved 1.200 o/min. i 8 minutter for at isolere knoglemarvsfraktionen.
- Hvis prøven ankommer i transportmedium, centrifugeres prøven ned ved 1.200 o/min. i 8 minutter, og transportmediet (supernatant) fjernes. Indpod resten af den nedcentrifugerede fraktion i bunden af røret.

For yderligere oplysninger om brug af disse produkter skal hvert laboratorium følge sine egne procedurer og protokoller, som er blevet specifikt udviklet og optimeret til laboratoriets eget medicinske program.

II. Knoglemarvskultur:

Marker alle dyrkningsbeholderne med patientnavn, prøvenummer og kulturype.

- Bring CHANG Marrow til stuetemperatur, inden prøven indpodes.
- Indpod hver kultur med en passende mængde prøve for at opnå en optimal koncentration på 1x10⁶ celler/ml eller 10 x 10⁶ celler pr. 10 ml kultur.
- Hvert enkelt laboratorium bestemmer antallet af kulturer, der skal opsættes, afhængigt af patientens kliniske indikation. Der kan eventuelt tilsættes ekstra vækstfaktorer.
- Inkuber kulturen ved 35-39 °C i en atmosfære med 5-8 % CO₂, indtil de er klar til at blive høstet.

Høst af kulturerne:

- Tag den høstklare kultur ud af inkubatoren, og hvirvl forsigtigt koblen rundt for at resuspendere cellerne.
- Overfør indholdet af hver kolbe til et 15 ml centrifugerør.
- Tilsæt 40 µl Colcemid-stamopløsning (10 µg/ml) til hvert kulturør. Luk rørene tæt til, og bland dem forsigtigt ved at vende dem op og ned.
- Inkuber rørene ved 35-39 °C i 45 minutter.
- Efter inkubation centrifugeres rørene i 8 minutter ved 1.000 o/min.
- Aspirer forsigtigt supernatanten ud af hvert rør ved hjælp af en vakuumaspirator med opløsnings-middeludskiller. Pas på ikke at aspirere pelleten.
- Resuspender cellepelleten ved at banke let på bunden eller siden af hvert rør med fingeren.
- Sæt en timer til 20 minutter.
- Tilsæt dråbevist 3-4 ml forvarmet (35-37 °C) hypotonisk opløsning (0,075 M kaliumklorid).
- Luk røret tæt til, og bland forsigtigt ved at banke let på bunden eller siden af røret med fingeren.
- Tilsæt dråbevist 5-6 ml forvarmet (35-37 °C) hypotonisk opløsning. Sæt låg på røret, og vend det op og ned.
- Gentag trin 9-11 for hvert rør.
- Lad rørene stå i et vandbad ved 35-37 °C. Vend rørene op og ned én gang ved midterpunktet af timerens 20 minutter.
- Ved slutningen af timerens 20 minutter tages rørene op af vandbadet, og 1 ml frisk 3:1 Carnoys fikseringsopløsning tilsættes hvert rør. Luk hvert rør tæt til, og vend det op og ned. (Dette er præ-fikseringstrinnet)

15. Centrifuger rørene i 8 minutter ved 1.000 o/min.

- Aspirer supernatanten fra hvert rør, og efterlad ca. 1 ml over cellepelleten. Pas på ikke at aspirere pelleten. Udvis forsigtighed mht. fibrøst materiale, der kan strække sig fra cellepelleten og op ind i supernatanten efter centrifugering. De sidste par ml supernatant skal muligvis fjernes med hånden med en Pasteurpipette (ikke med vakuumaspiration) for at undgå at aspirere hele cellepelleten ind i affaldsbeholderen.

- Resuspender cellepelleten, som beskrevet i trin 7.
- Tilsæt dråbevist 3-4 ml frisk 3:1 Carnoys fikseringsopløsning.

19. Tilsæt resten af fikseringsopløsningen op til 7 ml total volumen i hvert rør.

20. Gentag trin 16-19 for hvert rør.

21. Lad rørene stå i 10 minutter ved stuetemperatur. (Dette er det første fikseringstrin).

22. Centrifuger rørene i 8 minutter ved 1.000 o/min.

23. Aspirer supernatanten, og efterlad ca. 1 ml over cellepelleten. Resuspender cellepelleten.

24. Tilsæt fiksering, op til 7 ml. Centrifuger rørene i 8 minutter ved 1.000 o/min. (Andet fikseringstrin).

25. Gentag trin 22-23. (Tredje fikseringstrin).

26. På dette tidspunkt kan de fikserede cellepellets straks anvendes til forberedelse af objektglas ifølge laboratoriets standardprotokol eller opbevares i køleskab (2-8 °C) eller fryser til senere anvendelse.

OPBEVARING OG STABILITET

CHANG Marrow skal opbevares frossent under -10 °C indtil anvendelse. CHANG Marrow er stabil indtil udløbsdatoen på flaskeetiketten ved opbevaring i frossen tilstand. Efter opthøtning kan evt. ubrugt produkt afmåles i brugelige mængder og genfryses til senere anvendelse eller lukkes tæt til og opbevares ved 2-8 °C i op til 30 dage. Beskyttes mod fluorescerende lys.

FORHOLDSREGLER OG ADVARSLER

Dette udstyr er beregnet til brug af personale, der er uddannet i procedurer, der inkluderer den indicerede anvendelse, som dette udstyr er beregnet til.

CHANG Marrow indeholder FBS- og GCT-konditioneret medium og skal håndteres med universelle forholdsregler for laboratorier. Mediet indeholder et antibiotikum (gentamicinsulfat) for at reducere risikoen for bakteriel kontaminering, men der skal altid anvendes aseptiske teknikker ved dispensering af mediet. Et medium, der ikke er rødt, må ikke anvendes.

KÄYTTÖAIHE

CHANG Marrow on tarkoitettu käytettäväksi ihmisen luuytimen kliinisten primaariviljelmien karyotyyppin määrittämistä ja erilaisten hematologisten sairauksien muuta geneettistä testaamista varten.

VÄLINEEN KUVASU

CHANG Marrow on käyttövalmis liuos, joka sisältää IMDM-elatusainetta ja nautan sikiön seerumia, HEPES-puskuria, L-glutamiinia, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium -liuosta, rekombinantista ihmisen GM-CSF-kasvutekijää ja gentamysiinisulfaattia. CHANG Marrow on optimoitu tukemaan tehokasta luuydinsolujen kasvua sytogeneettista analyysiä varten. Minkään ainesosan sisältämistä ennen luuytimen viljelyä ei tarvita. CHANG Marrow sisältää gentamysiinisulfaattia (50 mg/l). Haluttaessa voidaan lisätä muita antibiootteja.

AINESOSAT

Aminohapot	Proteiinit, hormonit	Antibiotti
Alaniini	ja kasvutekijät	gentamysiinisulfaatti
Arginiini	naudan sikiön seerumi (FBS)	
Asparagiini	seerumi (FBS)	Muut
asparagiinihappo	hrGM-CSF	biotiini
kystiini		osteoklastooma-soluviljelmässä käytetty liuos
glutamiinihappo	Suolat ja ionit	(GCT-CM)
glutamiini	natriumkloridi	
glysiini	natriumseleniitti	
histidiini	kalsiumkloridi	
isoleusiini	kolimekloridi	Vitamiinit
leusiini	kaliiumkloridi	ja hiivenäiteet
lyysiini	kaliiumnitraatti	
metioniini	magnesiumsulfaatti	
fenyylilalaniini	natriumfosfaatti	
proliini		tiamiini
seriini	Puskurit	pantoteenihappo
treoniini	natrium-	kobalamiini
tryptofaani	bikarbonaatti	pyridoksiini
tyrosiini	HEPES	
valiini		Vesi
	Energiasubstraatit	injektioneisteisiin
	glukoosi	tarkoitettun veden
	pyruvaatti	laatuinen
	inositoli	

LAADUNVARMENNUS

Saatuun tulokseen voivat vaikuttaa useat tekijät, kuten näytteiden lähde, viljelyolosuhteet ja reagenssien valinta. Käyttäjää neuvotaan testaamaan jokainen uusi reagenssierä rinnakkain tunnetun, sopivan aktiivisuuden omaavan materiaalin kanssa ennen kuin erä otetaan rutiininomaiseen käyttöön. Riippumaton kliininen sytogeneettikkalaboratorio on testannut jokaisen CHANG Marrow -erän suorituskyvyn kliinisissä luuydinviljelmissä kontrolliliuokseen verrattuna. Tulokset ilmoitetaan eräkohtaisessa analyysisertifikaatissa.

TARVITTAVAT MATERIAALIT JA LAITTEISTOT, JOITA EI TOIMITETA MUKANA

- Muovisia steriilejä sentrifugiputkia ja viljelypulloja
- CO₂-lämpökaappi, 37 °C
- Pöytäsentrifugi
- Vortex-sekoitin
- Colcemid-kantaliuos, 10 µg/ml
- Kaliiumkloridiliuos, 0,075 M
- Fiksatiiviliuos, metanolii:etikahappo (3:1)

KÄYTÖN VALMISTUS

Sulata yön yli jääkaapissa (2–8 °C). Sekoita sitten varovasti homogeenisen liuoksen takaamiseksi. Jaa aseptisesti 10 ml liuosta steriileihin viljelypulloihin ja anna tasapainottua 37 °C:seen välitöntä käyttöä varten.

KÄYTTÖOHJEET

I. Näytteen valmistelu:

Käytä 0,5–1,0 ml natriumheparinisoitua luuydin-aspiraattia. Litiumhepariini, EDTA tai sitraatti-antikoagulantit eivät sovi sytogeneettisiin tutkimuksiin.

- Jos saadaan yli 5 ml luuydinaspiraattia, näyte saattaa olla laimentunut verellä. Sentrifugoi näyte pohjaan nopeudella 1 200 rpm (8 minuuttia) luuydinnäytteen eristämiseksi.
- Jos näyte saapuu kuljetusliuoksessa, sentrifugoi näyte pohjaan nopeudella 1 200 rpm (8 minuuttia) ja poista kuljetusliuos (supernatantti). Siirrosta käyttämällä jäljellä olevaa, putken pohjalle linkoutunutta osaa.

Kunkin laboratorion tulee katsoa lisäohjeet näiden tuotteiden käyttöä varten omista laboratoriokäytäntö- ja protokollaohjeistaan, jotka on kehitetty ja optimoitu nimenomaan laboratorion omaa terveydenhuolto-ohjelmaa varten.

II. Luuytimen viljely:

Merkitse kaikkiin viljelyastioihin potilaan nimi, näytenumero ja viljelytyyppi.

- Anna CHANG Marrow -liuoksen tasapainottua ympäristön lämpötilaan ennen näytteen siirostamista.
- Siirrosta kuhunkin viljelmään sopiva määrä näytettä, jotta saadaan optimaalinen pitoisuus 1 x 10⁶ solu/a/ml eli 10 x 10⁶ solua 10 ml:n viljelmää kohti.
- Jokaisen yksittäisen laboratorion on määritettävä aloitettavien viljelmien määrä potilaan kliinisen indikaation mukaisesti. Haluttaessa voidaan lisätä muita kasvutekijöitä.
- Inkuboi viljelmiä 35–39 °C:ssa 5–8-prosenttisisessa CO₂-ilmakehässä, kunnes ne ovat valmiita kerättäväksi.

Viljelmien kerääminen:

- Ota kerättäväksi valmis viljelmä lämpökaapist ja pyörytä pulloa hellävaroen sulujen suspendioimiseksi.
- Siirrä kunkin pullon sisältö 15 ml:n sentrifugiputkeen.
- Lisää 40 µl Colcemid-kantaliuosta (10 µg/ml) jokaiseen viljelyputkeen. Sulje putket tiukasti korkilla ja sekoita varovasti kääntelemällä.
- Inkuboi putkia 35–39 °C:ssa 45 minuutin ajan.
- Sentrifugoi putkia inkuboinnin jälkeen 8 minuuttia nopeudella 1 000 rpm.
- Aspiroi varovasti supernatantti kustakin putkesta alipaineaspiraattorilla, jossa on luotinlukko. Varo, ettet aspiroi pellettä.
- Suspendoi solupelletti uudelleen naputteleamalla kunkin putken pohjaa tai kylkeä sormella.
- Käynnistä 20 minuutin ajastin.
- Lisää tipoittain 3–4 ml esilämmitettyä (35–37 °C) hypotonista liuosta (0,075 M kaliiumkloridi).
- Sulje korkki tiiviisti ja sekoita napsuttelemalla hellävaroen putken pohjaa tai kylkeä sormella.
- Lisää tipoitain 5–6 ml esilämmitettyä (35–37 °C) hypotonista liuosta. Sulje korkki tiiviisti ja käännä putki.
- Toista vaiheet 9–11 kullekin putkelle.

- Käytä vesihaudetta ja anna putkien seistä 35–37 °C:ssa. Käännä putket kerran 20 minuutin ajastimen keskikohdalla.

- Kun 20 minuutin ajastus on päättynyt, poista putket vesihauteesta ja lisää 1 ml tuoretta Carnoy'n 3:1-fiksatiivia kuhunkin putkeen. Sulje tiiviisti korkilla ja käännä jokainen putki. (Tämä on esifiksatiivivaihe.)

- Sentrifugoi putkia 8 minuuttia nopeudella 1 000 rpm.
- Aspiroi supernatantti jokaisesta putkesta. Jätä noin 1 ml nestettä solupelletin yläpuolelle. Varo, ettet aspiroi pellettä. Varo säikeistä materiaalia, joka voi ulottua solupelletistä ylös supernatanttiin sentrifugoinnin jälkeen. Supernatantin viimeiset muutamat millilitrat on ehkä poistettava käsin pasteuripetillä (ei imuaspiraatiolla), jotta koko solupelletin imeminen jätettäisiin välttään.

- Suspendoi solupelletti uudelleen vaiheessa 7 kuvattulla tavalla.

- Lisää tipoitain 3–4 ml tuoretta Carnoy'n 3:1-fiksatiivia.

- Lisää loput fiksatiivista niin, että kokonaismäärä on enintään 7 ml.

- Toista vaiheet 16–19 kullekin putkelle.

- Anna seistä 10 minuuttia huoneenlämpötilassa. (Tämä on ensimmäinen fiksatiivivaihe.)

- Sentrifugoi putkia 8 minuuttia nopeudella 1 000 rpm.

- Aspiroi supernatantti jättäen noin 1 ml nestettä pelletin yläpuolelle. Suspendoi solupelletti uudelleen.

- Lisää fiksatiivia enintään 7 ml. Sentrifugoi putkia 8 minuuttia nopeudella 1 000 rpm. (Toinen fiksatiivivaihe.)

- Toista vaiheet 22–23. (Kolmas fiksatiivivaihe.)

- Fiksattuja solupellettejä voidaan tässä vaiheessa käyttää heti näytelasin valmistamiseen laboratorion vakiomenettelyllä tai säilyttää jääkaapissa (2–8 °C) tai pakastimessa myöhempää käyttöä varten.

SÄILYTTÄMINEN JA STABIILIUS

CHANG Marrow on säilytettävä pakastettuna alle –10 °C:ssa, kunnes sitä tarvitaan käyttöön. CHANG Marrow -liuos on stabiilia pullon etikettiin merkittyyn viimeiseen käyttöpäivään saakka, kun liuosta säilytetään pakastettuna. Sulatuksen jälkeen käyttämättä jäänyt liuos voidaan jakaa työskentelyeriin ja pakastaa uudelleen myöhempää käyttöä varten. Liuos säilyy tiukasti korkilla suljettuna ja 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 30 päivää. Suojaa loistevalaisimen valolta.

VAROIMET JA VAROITUKSET

Tämä väline on tarkoitettu sellaisten henkilöstön käytettäväksi, joka on koulutettu menetelmiin, joihin kuuluu välineen tarkoitettu, käyttöaiheen mukainen käyttö.

CHANG Marrow sisältää nautan sikiön seerumia ja GCT-solujen viljelyssä käytettyä elatusainetta, ja sitä on käsiteltyä laboratorion yleisiä varotoimia noudattaen. Liuos sisältää antibioottia (gentamysiinisulfaatti) bakteerikontaminaation mahdollisuuden vähentämiseksi, mutta liuosta jaettaessa on aina käytettävä aseptisia menetelmiä. Älä käytä mitään liuosta, joka ei ole väriltään punaista.

LATVISKI

LIETOŠANAS INDIKĀCIJA

Barotne „CHANG Marrow” ir paredzēta lietošanai klīnisko cilvēka kaulu smadzeņu kultūru primārajā kultivēšanā, lai veiktu kariotipu noteikšanu un citus ģenētiskos testus dažādu hematoloģisku traucējumu gadījumā.

IERĪCES APRAKSTS

„CHANG Marrow” ir lietošanai gatava barotne, kas sastāv no *IMDM* ar liellopu embriju serumu (*FBS*), HEPES bufera, L-glutāmiņa, gigantiskā šūnu audzēja (*GCT*) šūnu iedarbībā kondicionētas barotnes un rekombinanto cilvēka *GM-CSF* un gentamicīna sulfāta. „CHANG Marrow” ir optimizēta, lai veicinātu efektīvu kaulu smadzeņu šūnu augšanu citogēnētisku analīžu veikšanai. Pirms kaulu smadzeņu šūnu kultivēšanas nav nepieciešama citu sastāvdaļu pievienošana. „CHANG Marrow” satur gentamicīna sulfātu (50 mg/l). Ja vēlams, var pievienot papildu antibiotikas.

SASTĀVDAĻAS

Aminoskābes	Proteiņi, hormoni	Antibiotikas
Alanīns	un augšanas faktori	Gentamicīna sulfāts
Arginīns	Liellopu embriju serums	
Asparģīns		Citas
Asparģīnskābe	(<i>fetal bovine serum – FBS</i>)	Biotīns
Cistīns	hrGM-CSF	Gigantisko šūnu audzēja šūnu iedarbībā kondicionēta barotne (<i>GCT-CM</i>)
Glutāmīnskābe		
Glutamīns	Sāļi un joni	
Glicīns	Nātrija hlorīds	Vitamiņi un mikroelementi
Histiidīns	Nātrija selenīts	Folijskābe
Izoleicīns	Kalcija hlorīds	Nikotīnamīds
Leicīns	Holīna hlorīds	Riboflavīns
Lizīns	Kālija hlorīds	Tiamīns
Metionīns	Kālija nitrāts	Pantotēnskābe
Fenilalanīns	Magnija sulfāts	Kobalamīns
Prolīns	Nātrija fosfāts	Piridoksīns
Serīns		
Treonīns	Buferi	
Triptofāns	Nātrija bikarbonāts	
Tirozīns	HEPES	
Valīns		Ūdens
		Injekciju ūdens
	Enerģijas substrāti	(<i>WFI</i>) kvalitāte
	Glikoze	
	Piruvāts	
	Inozīts	

KVALITĀTES NODROŠINĀŠANA

legūto rezultātu var ietekmēt vairāki faktori, tostarp paraugu ieguves avots, kultivēšanas apstākļi un reaģentu izvēle. Pirms apstiprināšanas izmantošanai ikdienas praksē lietotājiem ir ieteicams izmēģināt iekvien jaunū reaģenta partiju, paralēli lietojot salīdzināmo materiālu, kura iedarbība ir zināma un piemērota. Katras „CHANG Marrow” sērijas iedarbība ir testēta klīniskās kaulu smadzeņu kultūras neatkarīgā klīniskās citogēnētikas laboratorijā, salīdzinot to ar kontrolbarotni. Rezultāti tiek ziņoti katrai partijai īpašā analīzes sertifikātā.

NEPIECIEŠAMIE, BET NEIETVERTIE MATERIĀLI

- Sterili centrifūgas plastmasas stobriņi un kultūras flakoni
- CO₂ inkubators 37 °C temperatūrā
- Laboratorijas galdā centrifūga
- Virpulmaisītājs
- Standartšķīdums „Colcemid” 10 µg/ml
- Kālija hlorīda šķīduma 0,075 M
- Fiksācijas šķīdums, metilspirts:etiškābe (3:1)

SAGATAVOŠANA LIETOŠANAI

Uz nakti atstāriet atļaidināties ledusskapī (2–8 °C), tad uzmanīgi samaisiet līdz viendabīgai konsistencei. Aseptiski dozējiet 10 ml barotnes sterilos kultūras flakonos un nostabilizējiet 37 °C temperatūrā tūlītējai izmantošanai.

LIETOŠANAS NORĀDĪJUMI

I. Parauga sagatavošana

izmantojiet 0,5 līdz 1,0 ml ar nātriju heparinizētu kaulu smadzeņu aspirātu. Liģija heparīns, *EDTA* vai citrāts saturāsi antikoagulanti nav piemēroti citogēnētiskiem pētījumiem.

- Ja saņemts vairāk nekā 5 ml kaula smadzeņu aspirāta, paraugs var būt ar sašķidrinātām asinīm. Centrifugējiet paraugu ar ātrumu 1200 apgr./min 8 minūtes, lai izolētu kaulu smadzeņu frakciju.
- Ja paraugs ticis piegādāts transportēšanas barotnē, 8 minūtes centrifugējiet to ar ātrumu 1200 apgr./min un atdaliel transportēšanas barotni (centrifugātu). Inokulējiet, izmantojot atlikušo centrifugēto frakciju stobriņa apakšā.

Papildu informācija par šo produktu lietošanu meklējama katras laboratorijas procedūru aprakstos un protokolos, kas īpaši izstrādāti un optimizēti individuālajai medicīniskajai programmai.

II. Kaulu smadzeņu kultūra

Marķējiet visus kultūras traukus ar pacienta vārdu, uzvārdu, parauga numuru un kultūras veidu.

- „CHANG Marrow” barotnei pirms inokulācijas jābūt apkārtējās vides temperatūrā.
- Katrā kultūrā inokulējiet atbilstošu parauga daudzumu, lai sasniegtu optimālo koncentrāciju 1 x 10⁶ šūnas/ml vai 10 x 10⁶ šūnas uz 10 ml kultūras.
- Sagatavojamo kultūru skaitis katrai laboratorijai jānosaka atbilstīgi pacienta klīniskajai indikācijai. Ja nepieciešams, var pievienot arī papildu augšanas faktorus.
- Kultūras inkubējiet 35–39 °C temperatūrā un 5–8% CO₂ atmosfērā, līdz tās ir gatavas ievākšanai.

Kultivētā materiāla ievākšana

- No inkubatora izņemiet kultūru, kas ir gatava ievākšanai, bet kbolu mazliet pagroziet, lai atkārtoti suspendētu šūnas.
- Pāriesiet katra flakona saturu uz 15 ml centrifūgas stobriņu.
- Katrā kultūras stobriņā pievienojiet 40 µl colcemīda standartšķīduma (10 µg/ml). Stobriņus cieši aizvākojiet un saturu samaisiet, stobriņus uzmanīgi apvēršot.
- Stobriņus inkubējiet 35–39 °C temperatūrā 45 minūtes.
- Pēc inkubācijas stobriņus 8 minūtes centrifugējiet ar ātrumu 1000 apgr./min.
- No katra stobriņa, izmantojot vakuuma nosūcēju ar šķīdinātāja uzvērēju, uzmanīgi atšūciet centrifugātu. Jāuzmanās, lai neatsūktu lodīti.
- Atkārtoti suspendējiet šūnu lodīti, ar pirkstu pasitot pa katra stobriņa dibenu vai sāniem.
- Palaidiet 20 minūšu taimeri.
- Pilniot pievienojiet 3–4 ml iepriekš sasildīta (35–37 °C) hipotoniskā šķīduma (0,075 M kālija hlorīda).
- Stobriņu cieši aizvākojiet un saturu samaisiet, ar pirkstu pasitot pa stobriņa dibenu vai sāniem.

- Pilniot pievienojiet 5–6 ml iepriekš sasildīta (35–37 °C) hipotoniskā šķīduma. Stobriņu cieši aizvākojiet un apvēršiet.
- 9.–11. darbību veiciet katram stobriņam.
- Stobriņus atstājiēt ūdens peldē 35–37 °C temperatūrā. Tiklīdz pienācis 20 minūšu taimera puslaiks, stobriņus apvēršiet.
- 20 minūšu taimera beigās stobriņus izņemiet no ūdens peldes un pievienojiet 1 ml svaiga „Carnoy” fiksācijas šķīduma porcijā 3:1. Katru stobriņu cieši aizvākojiet un apvēršiet. (Št darbība jāveic pirms fiksācijas.)

- Stobriņus 8 minūtes centrifugējiet ar ātrumu 1000 apgr./min.

- No katra stobriņa atšūciet centrifugātu, atstājot apmēram 1 ml virs šūnu lodītes. Jāuzmanās, lai neatsūktu lodīti. uzmanieties, rīkojoties ar šķiedrainu materiālu, kas pēc centrifugēšanas no šūnu lodītes var iestiepties centrifugātā. Pēdējos centrifugātā ml varbūt vajadzēs atdalīt manuāli ar Pastēra pipeti (nelietojot vakuuma nosūcēju), lai atkārtumu konteinerā neiesūktu pilnīgi visu šūnu lodīti.

- Atkārtoti suspendējiet šūnu lodīti, kā aprakstīts 7. darbībā.

- Pilniot pievienojiet 3–4 ml „Carnoy” fiksācijas šķīduma proporcijā 3:1.

- Atlikušo fiksācijas šķīdumu pievienojiet līdz kopējam tilpumam 7 ml.

- 16.–19. darbību veiciet katram stobriņam.

- 10 minūtes atstājiēt istabas temperatūrā. (Št ir pirmā fiksācijas darbība.)

- Stobriņus 8 minūtes centrifugējiet ar ātrumu 1000 apgr./min.

- Atšūciet centrifugātu, atstājot apmēram 1 ml virs lodītes. Atkārtoti suspendējiet šūnu lodīti.

- Fiksācijas šķīdumu pievienojiet līdz 7 ml. Stobriņus 8 minūtes centrifugējiet ar ātrumu 1000 apgr./min. (Otrā fiksācijas darbība.)

- Atkārtojiet 22.–23. darbību. (Trešā fiksācijas darbība.)

- Nekustīgās šūnu lodītes šajā posmā var izmantot nekavējoties, lai saskaņā ar laboratorijas standarta protokolu sagatavotu priekšmetstiklīņus, vai noglabāt ledusskapī (2–8 °C temperatūrā) vai saldētāvā izmantošanai vēlāk.

GLABĀŠANA UN STABILITĀTE

„CHANG Marrow” temperatūrā zem –10 °C jāglabā sasaldēta līdz gatavībai to lietot. Glabājot sasaldētā veidā, „CHANG Marrow” saglabā stabilitāti līdz derīguma termiņam, kas norādīts uz pudeles etiķetes. Neizlietotā produkta pārpalikums pēc atkausēšanas var sadalīt darbā izmantojamās devās un atkārtoti sasaldēt izmantošanai vēlāk vai ne ilgāk kā 30 dienas cieši noslēgtus glabāt 2–8 °C temperatūrā. Aizsargājiēt no fluorescējošas gaismas.

PIESARDZĪBAS PASĀKUMI UN BRĪDINĀJUMI

Št ierīce ir paredzēta procedūras, arī tādās, kurām št ierīce ir paredzēta, apmācīta personāla lietošanai.

„CHANG Marrow” satur liellopu embriju šķīdumu (*FBS*) un gigantisko šūnu audzēja (*GCT*) šūnu iedarbībā kondicionētu barotni, tādēļ ar to jārikojas, ievērojot universālus laboratorijas piesardzības pasākumus. Barotne satur antibiotiku gentamicīna sulfātu, lai samazinātu baktēriju kontaminācijas iespējāmību, taču, dozējot barotni, vienmēr jāizmanto aseptiska tehnika. Nelietojiet barotni, ja tā nav sarkanā krāsā.

NEDERLANDS

INDICATIE VOOR GEBRUIK

CHANG Marrow is bedoeld voor gebruik in de primaire kweek van klinische menselijke beenmergkweken voor karyotypering en andere genetische testen van diverse hematologische stroomissen.

BESCHRIJVING VAN HET HULPMIDDEL

CHANG Marrow is een kant-en-klaar medium bestaande uit IMDM met FBS, HEPES buffer, L-glutamine, Giant Cell Tumor (GCT) geconditioneerd medium, recombinant menselijk GM-CSF en gentamicinesulfaat. CHANG Marrow is geoptimaliseerd ter ondersteuning van een efficiënte groei van beenmergcellen voor cytogenetische analyse. Toevoeging van componenten is niet vereist voordat het beenmerg op kweek wordt gezet. CHANG Marrow bevat gentamicinesulfaat (50 mg/l). Aanvullende antibiotica kunnen desgewenst worden toegevoegd.

COMPONENTEN

Aminozuren	Eiwitten, hormonen	Antibioticum
Alanine	en groeifactoren	Gentamicinesulfaat
Arginine	Voetaal	
Asparagine	runderserum (FBS)	<u>Overige</u>
Asparaginezuur	hrGM-CSF	Biotine
Cystine		Giant Cell Tumor
Glutaminezuur		geconditioneerd
Glutamine		medium (GCT-CM)
Glycine		Natriumseleniet
Histidine		Calciumchloride
Isoleucine		Cholinechloride
Leucine		Kaliumchloride
Lysine		Kaliumnitraat
Methionine		Riboflavine
Fenylalanine		Thiamine
Proline		Pantotheenzuur
Serine	<u>Buffers</u>	Cobalamine
Treonine	Natriumbicarbonaat	Pyridoxine
Tryptofaan	HEPES	
Tyrosine		<u>Water</u>
Valine	<u>Energiesubstraten</u>	Farmaceutisch kwaliteitswater (WFI)
	Glucose	
	Pyruvaat	
	Inositol	

KWALITEITSBORGING

Diverse factoren, waaronder de bron van de monsters, de kweekomstandigheden en de selectie van reagentia, kunnen van invloed zijn op het verkregen resultaat. Gebruikers wordt aangeraden elke nieuwe reagensbatch parallel met het referentiemateriaal met bekende geschikte activiteit te gebruiken voordat het routinematig wordt gebruikt. De prestaties van elke partij CHANG Marrow zijn getest op klinische beenmergkweken in een onafhankelijk klinisch cytogenetisch laboratorium en vergeleken met een controlemedium. De resultaten worden vermeld op een partijspecifiek analysecertificaat.

VEREISTE MAAR NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN EN APPARATUUR

- Steriele kunststof centrifugeerbuisjes en kweekflessen
- CO₂-incubator bij 37 °C
- Tafelcentrifuge
- Vortexmenger
- Colcemide-standaardoplossing, 10 µg/ml
- Kaliumchlorideoplossing, 0,075 M
- Fixeeroplossing, methanol:azijnzuur (3:1)

VOORBEREIDING OP HET GEBRUIK

Laat een nacht in de koelkast (bij 2-8 °C) ontdooien en meng daarna voorzichtig om homogeniteit te garanderen. Breng op aseptische wijze 10 ml medium over in steriele kweekflessen en equilibreer tot 37 °C, waarna het direct kan worden gebruikt.

GEBRUIKSAANWIJZING

I. Monsterpreparatie:

Gebruik 0,5 tot 1,0 ml met natrium gehepariniseerd beenmergaspiraat. Lithiumheparine, EDTA of citraatanti-coagulanten zijn niet geschikt voor cytogenetisch onderzoek.

- Als meer dan 5 ml beenmergaspiraat wordt ontvangen, kan er sprake zijn van hemodilutie van het monster. Centrifugeer het monster gedurende 8 minuten op 1200 omw/min om de beenmergfractie te isoleren.
- Als het monster in transportmedium wordt ontvangen, centrifugeert u het monster gedurende 8 minuten op 1200 omw/min en verwijdt u het transportmedium (supernatant). Inoculeer met behulp van de resterende uitgencentrifugeerde fractie op de bodem van het buisje.

Voor aanvullende informatie over het gebruik van deze producten dienen alle laboratoria hun eigen laboratoriumprocedures en -protocollen te raadplegen die speciaal zijn ontwikkeld en geoptimaliseerd voor uw individueel medisch programma.

II. Beenmergkweek:

Plak op alle kweekflessen een label met daarop de naam van de patiënt, het monsternummer en het kweektype.

- Breng CHANG Marrow op omgevingstemperatuur voordat u het monster inoculeert.
- Inoculeer elke kweek met een passende hoeveelheid monster tot een optimale concentratie van 1 x 10⁶ cellen/ml of 10 x 10⁶ cellen per 10 ml kweek.
- Elk laboratorium dient individueel te bepalen hoeveel kweken er moeten worden gemaakt aan de hand van de klinische indicatie van de patiënt. Aanvullende groeifactoren kunnen desgewenst worden toegevoegd.
- Incubeer de kweken bij 35-39 °C en 5-8% CO₂-atmosfeer tot ze kunnen worden geoogst.

Oogsten van de kweken:

- Haal de kweek die kan worden geoogst, uit de incubator en draai de fles voorzichtig rond om de cellen te resuspenderen.
- Breng de inhoud van elke fles over naar een centrifugeerbuisje van 15 ml.
- Voeg aan elk kweekbuisje 40 µl standaardcolcemide (10 µg/ml) toe. Sluit de buisjes goed met een dop af en meng de inhoud voorzichtig door de buisjes om te keren.
- Incubeer de buisjes gedurende 45 minuten bij 35-39 °C.
- Centrifugeer de buisjes na incubatie gedurende 8 minuten op 1000 omw/min.
- Aspireer supernatant voorzichtig uit elk buisje met behulp van een vacuümaspirator met opvangreservoir voor oplosmiddelen. Wees voorzichtig dat u de pellet niet aspireert.
- Resuspendeer de celpellet door met een vinger tegen de bodem of de zijkant van elk buisje te tikken.
- Stel een timer in op 20 minuten.
- Voeg druppelsgewijs 3-4 ml voorverwarmede (35-37 °C) hypotone oplossing (0,075 M kaliumchloride) toe.
- Sluit het buisje goed met een dop af en meng de inhoud voorzichtig door met een vinger tegen de bodem of de zijkant van het buisje te tikken.
- Voeg druppelsgewijs 5-6 ml voorverwarmede (35-37 °C) hypotone oplossing toe. Sluit het buisje goed met een dop af en keer het buisje om.

- Herhaal stap 9 t/m 11 voor elk buisje.

- Laat, met behulp van een waterbad, de buisjes staan bij 35-37 °C. Keer de buisjes eenmaal om wanneer de 20 minuten van de timer voor de helft zijn verstreken.

- Aan het einde van de 20 minuten van de timer verwijdt u de buisjes uit het waterbad en voegt u aan elk buisje 1 ml verse 3:1 Carnoy's fixeeroplossing toe. Sluit elk buisje goed af met een dop en keer het om. (Dit is de stap voorafgaand aan fixatie.)

- Centrifugeer de buisjes 8 minuten op 1000 omw/min.

- Aspireer het supernatant uit elk buisje en laat ongeveer 1 ml boven de celpellet staan. Wees voorzichtig dat u de pellet niet aspireert. Wees voorzichtig met vezelig materiaal dat na het centrifugeren vanuit de celpellet tot in het supernatant kan reiken. Het kan nodig zijn om de laatste paar ml supernatant handmatig met een pasteurpipet te verwijderen (zonder vacuümaspiratie) om aspiratie van de gehele celpellet in de afvalbak te voorkomen.

- Resuspendeer de celpellet zoals beschreven in stap 7.

- Voeg druppelsgewijs 3-4 ml verse 3:1 Carnoy's fixeeroplossing toe.

- Voeg resterende fixeeroplossing toe tot 7 ml.

- Herhaal stap 16 t/m 19 voor elk buisje.

- Laat gedurende 10 minuten staan bij kamer-temperatuur. (Dit is de eerste stap van fixatie.)

- Centrifugeer de buisjes 8 minuten op 1000 omw/min.

- Aspireer het supernatant en laat ongeveer 1 ml boven de pellet staan. Resuspendeer de celpellet.

- Voeg fixeeroplossing toe tot 7 ml. Centrifugeer de buisjes 8 minuten op 1000 omw/min. (Dit is de tweede stap van fixatie.)

- Herhaal stap 22 en 23. (Dit is de derde stap van fixatie.)

- Nu kunnen de gefixeerde celpelleten direct worden gebruikt voor het prepareren van het objectglasje volgens het standaardprotocol van het laboratorium of in de koelkast (bij 2-8 °C) of in de vriezer worden bewaard voor toekomstig gebruik.

BEWAREN EN STABILITEIT

Bewaar CHANG Marrow bevroren bij een temperatuur lager dan -10 °C tot het moment van gebruik. CHANG Marrow is stabiel tot de houdbaarheidsdatum op het etiket van de fles, mits het product ingevroren wordt bewaard. Na ontdooien kan ongebruikt product worden opgedeeld in praktische hoeveelheden en opnieuw worden ingevroren voor later gebruik of gedurende maximaal 30 dagen bij 2 °C tot 8 °C worden bewaard, mits stevig met de dop afgesloten. Bescherm tegen fluorescentielicht.

VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Dit hulpmiddel is bedoeld voor gebruik door personeel dat opgeleid is in procedures waaronder de aangegeven toepassing waarvoor het hulpmiddel is bedoeld.

CHANG Marrow bevat FBS en GCT geconditioneerd medium en dient met inachtneming van universele voorzorgsmaatregelen voor laboratoria te worden behandeld. Het medium bevat een antibioticum (gentamicinesulfaat) om de kans op bacteriële besmetting te verlagen, maar aseptische technieken dienen altijd te worden toegepast bij het doseren van het medium. Gebruik geen medium dat niet rood van kleur is.

POLSKI

PRZEZNACZENIE

Pożyłka CHANG Marrow jest przeznaczona do użytku do hodowli pierwotnej próbek klinicznych ludzkiego szpiku kostnego do karyotypowania i innych testów genetycznych na różne schorzenia hematologiczne.

OPIS WYROBU

Produkt CHANG Marrow to pożyłka gotowa do użycia, w której skład wchodzi pożyłka IMDM z FBS, bufor HEPES, L-glutamina, pożyłka Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium, rekombinowany ludzki GM-CSF i siarczan gentamycyny. Pożyłkę CHANG Marrow zoptymalizowano pod kątem wydajnego wzrostu komórek szpiku kostnego do analizy cytogenetycznej. Przed założeniem hodowli szpiku kostnego nie jest konieczne dodawanie żadnych dodatkowych składników. Pożyłka CHANG Marrow zawiera siarczan gentamycyny (50 mg/l). W razie potrzeby można dodać dodatkowe antybiotyki.

SKŁADNIKI

<u>Aminokwasy</u>	<u>Białka, hormony</u>	<u>Antybiotyki</u>
Alanina	<u>i czynniki wzrostu</u>	Siarczan
Arginina	Plodowa surowica	gentamycyny
Asparagina	bydłeca (FBS)	
Kwas asparaginowy	hrGM-CSF	
Cystyna		<u>Inne</u>
Kwas glutaminowy	<u>Sole i jony</u>	Biotyna
Glutamina	Chlorek sodu	Pożyłka Giant cell
Glicyna	Selenian sodu	tumor conditioned
Histydyna	Chlorek wapnia	medium (GCT-CM)
Izoleucyna	Chlorek choliny	
Leucyna	Chlorek potasu	<u>Witaminy</u>
Lizyna	Azotan potasu	<u>i pierwiastki śladowe</u>
Metionina	Siarczan magnezu	Kwas foliowy
Fenylalanina	Fosforan sodu	Nikotynamid
Prolina		Ryboflawina
Seryna	<u>Bufor</u>	Tiamina
Treonina	Wodorowęglan sodu	Kwas pantotenowy
Tryptofan	Kobalamina	
Tyrozyna	HEPES	Pyrydoksyna
Walina		
	<u>Substraty energetyczne</u>	<u>Woda</u>
	Glukoza	Woda o jakości WFI
	Pirogrian	
	Inozytol	

ZAPEWNIANIE JAKOŚCI

Na uzyskany wynik może wpłynąć wiele czynników, w tym pochodzenie próbek, warunki hodowli i wybór odczynników. Zalecane jest, aby przed przyjęciem do rutynowego stosowania nowej serii odczynnika użytkownicy przetestowali ją równoległe z materiałem referencyjnym o znanej, odpowiedniej aktywności. Każdą serię pożyłki CHANG Marrow przetestowano pod kątem skuteczności w porównaniu do pożyłki kontrolnej na hodowlach klinicznych szpiku kostnego w niezależnych laboratoriach cytogenetyki klinicznej. Wyniki przedstawiono na swoistym dla danej serii Świadectwie analizy.

MATERIAŁY I WYPOSAŻENIE WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

- Steryline, wykonane z tworzywa sztucznego próbówki wirówkowe i butelki hodowlane.
- Incubator z atmosferą CO₂, nastawiony na temperaturę 37°C
- Wirówka laboratoryjna
- Wyrząsarka
- Roztwór podstawowy kolcemidu, 10 µg/ml
- Roztwór chlorku potasu, 0,075 M
- Roztwór utrwalający, metanol:kwas octowy (3:1)

PRZYGOTOWANIE DO UŻYCIA

Rozmrażać pożyłkę przez noc w chłodziarce (2–8°C), a następnie delikatnie wymieszać, aby zapewnić jednorodność roztworu. W sposób aseptyczny rozdzielić po 10 ml pożyłki do sterylnych butelek hodowlanych i zrównoważyć do temperatury 37°C w celu niezawolcznego użycia.

INSTRUKCJA UŻYCIA

I. Przygotowanie próbki:

Użyć od 0,5 do 1,0 ml aspiratu szpiku kostnego z heparyną sodową. Antykoagulanty, takie jak heparyna litowa, EDTA lub cytrynian nie są odpowiednie do badań cytogenetycznych.

- Jeśli uzyskano więcej niż 5 ml aspiratu szpiku kostnego, próbka może być rozcieńczona krwią. Wirować próbkę przy 1200 rpm przez 8 minut, aby oddzielić frakcję szpiku kostnego.
- Jeśli próbkę dostarczono w pożyłyce transportowej, wirować ją przy 1200 rpm przez 8 minut i usunąć pożyłkę transportową (nadsącz). Posiać komórki, używając frakcji aspiratu pozostałej na dnie próbówki.

Szczegółowe informacje o wykorzystaniu tych produktów należy zweryfikować w wewnętrznych procedurach oraz protokołach laboratorium, które opracowano i zoptymalizowano pod kątem poszczególnych programów medycznych.

II. Hodowla komórek szpiku kostnego:

Opisać wszystkie naczynia hodowlane imieniem i nazwiskiem pacjenta, numerem próbki i typem hodowli.

- Przed posiewem próbki doprowadzić pożyłkę CHANG Marrow do temperatury otoczenia.
- Posiać każdą hodowlę, używając odpowiedniej ilości próbki, aby osiągnąć optymalne stężenie równe 1 x 10⁶ komórek/ml lub 10 x 10⁶ komórek na 10 ml hodowli.
- Każde laboratorium powinno określić liczbę nastawianych hodowli w zależności od wskazania klinicznego pacjenta. W razie potrzeby można dodać dodatkowe czynniki wzrostu.
- Inkubować hodowlę w temperaturze 35–39°C w atmosferze 5–8% CO₂, aż hodowle będą gotowe do zbioru.

Zbiór hodowli:

- Wyjąć hodowlę gotowe do zbioru z inkubatora i delikatnie obracać butelki ruchem wirowym, aby zawiesić komórki.
- Przenieść zawartość każdej butelki do próbówki wirówkowej o pojemności 15 ml.
- Dodać po 40 µl roztworu podstawowego kolcemidu (10 ug/ml) do każdej próbówki hodowlanej. Dobrze zamknąć próbówki i delikatnie wymieszać, odwracając.
- Inkubować próbówki w temperaturze 35–39°C przez 45 minut.
- Po inkubacji wirować próbówki przez 8 minut przy 1000 rpm.
- Ostrożnie zaaspirować nadsącz z każdej próbówki, używając aspiratora próżniowego z pałąpką z rozpuszczalnikami. Uważać, aby nie zaaspirować osadu.
- Zawiesić osad komórkowy, stukając płacem w dno lub boczną część próbówki.
- Uruchomić minutnik ustawiony na 20 minut.
- Dodać kroplami 3–4 ml wstępnie ogrzanego (35–37°C) roztworu hipotonicznego (chlorek potasu w stężeniu 0,075 M).
- Dobrze zamknąć próbówkę i delikatnie wymieszać jej zawartość, stukając płacem w dno lub boczną część próbówki.

- Dodać kroplami 5–6 ml wstępnie ogrzanego (35–37°C) roztworu hipotonicznego. Dobrze zamknąć próbówkę i odwrócić ją.
- Powtórzyć kroki 9–11 dla każdej próbówki.
- Włożyć próbówki do łaźni wodnej nastawionej na temperaturę 35–37°C. Odwrócić próbówki jeden raz po upływie połowy czasu ustawionego na minutniku (20 minut).

- Po upływie 20-minutowego odliczania wyjąć próbówki z łaźni wodnej i dodać po 1 ml świeżo przygotowanego (stosunek 3:1) roztworu utrwalającego Carnoy'a do każdej próbówki. Dobrze zamknąć i odwrócić każdą próbówkę. (Jest to krok wstępnego utrwalania).

- Wirować próbówki przez 8 minut przy 1000 rpm.

- Zaaspirować nadsącz z każdej próbówki, pozostawiając około 1 ml roztworu nad osadem komórkowym. Uważać, aby nie zaaspirować osadu. Należy uważać na materiał włóknisty, który po odwirowaniu może wystawać z osadu komórkowego do nadsącza. Aby uniknąć zaaspirowania całego osadu komórkowego do zbiornika na odpady, może być konieczne ręczne usunięcie ostatnich kilku ml nadsącza za pomocą pipety Pasteura (nie korzystając z aspiracji próżniowej).

- Zawiesić osad komórkowy zgodnie z opisem w kroku 7.

- Dodać kroplami 3–4 ml świeżo przygotowanego (stosunek 3:1) roztworu utrwalającego Carnoy'a.

- Uzupełnić pozostałą objętość roztworem utrwalającym — do 7 ml.

- Powtórzyć kroki 16–19 dla każdej próbówki.

- Pozostawić próbówki w temperaturze pokojowej na 10 minut. (Jest to pierwszy krok utrwalania).

- Wirować próbówki przez 8 minut przy 1000 rpm.

- Zaaspirować nadsącz, pozostawiając około 1 ml roztworu nad osadem. Zawiesić osad komórkowy.

- Dodać roztwór utrwalający do objętości 7 ml. Wirować próbówki przez 8 minut przy 1000 rpm. (Drugi krok utrwalania).

- Powtórzyć kroki 22–23. (Trzeci krok utrwalania).

- Na tym etapie można od razu użyć utrwalonych osadów komórkowych do przygotowania preparatów zgodnie ze standardowym protokołem laboratorium lub przechowywać osady w chłodziarce (2–8°C) lub zamrażarce do późniejszego użytku.

PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ

Pożyłkę CHANG Marrow należy przechowywać zamrożoną w temperaturze poniżej –10°C do czasu użycia. Pożyłka CHANG Marrow zachowuje stabilność do upływu terminu ważności podanego na etykiecie butelki, jeśli jest przechowywana w stanie zamrożonym. Po rozmrożeniu nieużyty produkt można rozdzielić na porcje robocze i zamrozić ponownie do późniejszego użytku lub szczerlnie zamknąć i przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C do 30 dni. Chronić przed światłem fluorescencyjnym.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Ten wyrób jest przeznaczony do użtyku przez personel wykwalifikowany w dziedzinie procedur obejmujących wskazane zastosowanie, do którego wyrób ten jest przeznaczony.

Pożyłka CHANG Marrow zawiera FBS i pożyłkę GCT-CM i należy z nią postępować, przestrzegając standardowych środków ostrożności obowiązujących w laboratorium. Aby zmniejszyć ryzyko zanieczyszczenia bakteriynego, pożyłka zawiera antybiotyki (siarczan gentamycyny). Podczas rozdzielania pożyłki należy jednak zawsze stosować techniki aseptyczne. Nie używać pożyłki, która nie ma czerwonego koloru.

ROMÂNĂ

INDICAȚIE DE UTILIZARE

CHANG Marrow este destinat utilizării la cultivarea primară a culturilor clinice de măduvă osoasă de origine umană pentru cariotipare și alte teste genetice pentru diferite tulburări hematologice.

DESCRIEREA DISPOZITIVULUI

CHANG Marrow este un mediu gata pentru utilizare care conștă din IMDM, cu FBS, tampon HEPES, L-glutamină, mediu condiționat pentru tumori cu celule gigant (GCT), GM-CSF uman recombinant și sulfat de gentamicină. CHANG Marrow a fost optimizat pentru a susține creșterea eficientă a celulelor din măduva osoasă pentru analiza citogenetică. Nu este necesară adăugarea niciunor alte componente înainte de cultivarea măduvei osoase. CHANG Marrow conține suflat de gentamicină (50 mg/L). Dacă se dorește, se pot adăuga antibiotice suplimentare.

COMPONENTE

<u>Aminoacizi</u>	<u>Proteine, hormoni și factori de creștere</u>	<u>Antibiotic</u>
Alanină	Ser fetal bovin	Sulfat de gentamicină
Arginină	(SFB)	
Asparagină	hrGM-CSF	<u>Altul</u>
Acid aspartic		Biotină
Cistină		Mediu condiționat pentru tumori cu celule gigant (GCT-CM)
Acid glutamic	<u>Săruri și ioni</u>	<u>Vitamine și oligoelemente</u>
Glutamină	Clorură de sodiu	Acid folic
Glicină	Selenit de sodiu	Nicotinamidă
Histidină	Clorură de calciu	Riboflavină
Izoleucină	Clorură de colină	Tiamin
Leucină	Clorură de potasiu	Acid pantotenic
Lizină	Sulfat de magneziu	Cobalamină
Metionină	Fosfat de sodiu	Pindoxină
Fenilalanină		
Prolină	<u>Soluții tampon</u>	
Serină	Bicarbonat de sodiu	
Treonină	HEPES	
Triptofan		
Tirozină	<u>Substraturi energetice</u>	<u>Apă</u>
Valină	Glucoză	Calitate WFI (water for injection)
	Piruvat	[apă sterilă pentru injecții]
	Inozitol	

ASIGURAREA CALITĂȚII

Mai mulți factori, printre care se numără sursa de specimene, condițiile de cultivare și selecția reactivilor, pot influența rezultatul obținut. Înainte de adoptarea pentru utilizarea de rutină, utilizatorii sunt sfătuiți să ruleze fiecare lot de reactiv în paralel cu materialul de referință despre care se cunoaște că acționează adecvat. Fiecare lot de CHANG Marrow a fost testat în privința performanței pe culturile clinice de măduvă osoasă în comparație cu un mediu de control într-un laborator de citogenetică medicală independent. Rezultatele sunt raportate într-un certificat de analiză specific pentru fiecare lot.

MATERIALE ȘI APARATURĂ NECESARE, DAR NEFURNIZATE

- Eprubete de centrifugă din plastic sterile și vase de cultură
- Incubator cu CO₂ la 37 °C
- Centrifugă de masă
- Agitator vortex
- Soluție stoc de Colcemid, 10 µg/mL
- Soluție de clorură de potasiu, 0,075 M
- Soluție de fixativ, metanol:acid acetic (3:1)

PREGĂTIREA PENTRU UTILIZARE

Dezghetați peste noapte la frigider (2 - 8 °C), apoi agitați ușor pentru a asigura omogenitatea. Transferați aseptíc 10 ml de mediu în vase de cultură sterile și echilibrați la 37 °C pentru utilizarea imediată.

INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

I. Pregătirea probei:

Folosiți între 0,5 și 1,0 mL de aspirat de măduvă osoasă pe heparină sodică. Anticoagulanții pe bază de litiu heparină, EDTA sau citrat nu sunt corespunzători pentru studiile citogenetice.

- Dacă s-au recoltat mai mult de 5 ml de aspirat de măduvă osoasă, proba poate fi hemodiluată. Centrifugați proba la 1.200 rpm timp de 8 minute pentru a izola fracția de măduvă osoasă.
- Dacă proba sosește într-un mediu de transport, centrifugați proba la 1.200 rpm timp de 8 minute și îndepărtați mediul de transport (supernatantul). Inoculați folosind restul de fracție centrifugată de pe fundul eprubetei.

Pentru detalii suplimentare privind folosirea acestor produse, fiecare laborator trebuie să își consulte propriile proceduri și protocoale de laborator, care au fost elaborate și optimizate special pentru programul dvs. medical individual.

II. Cultivarea de măduvei osoase:

Etichetați toate vasele de cultură cu numele pacientului, numărul probei și tipul de cultură.

- Înainte de a inocula specimenul, aduceți CHANG Marrow la temperatura ambiantă.
- Inoculați fiecare cultură cu cantitatea de probă corespunzătoare pentru a obține o concentrație optimă de 1 x 10⁶ celule/ml sau 10 x 10⁶ celule la 10 ml cultură.
- Fiecare laborator individual ar trebui să stabilească numărul de culturi care trebuie realizate în funcție de indicația clinică pentru pacient. Dacă se dorește, se pot adăuga factori de creștere suplimentari.
- Incubați culturile la o atmosferă de 35 - 39 °C, 5 - 8 % CO₂ până când sunt gata de recoltat.

Recoltarea culturilor:

- Îndepărtați cultura gata de recoltat din incubator și rotiți ușor vasul pentru a resuspenda celulele.
- Transferați conținutul fiecărui vas într-o eprubetă de centrifugă pentru 15 mL.
- Adăugați în fiecare eprubetă de cultură 40 µl de soluție stoc de Colcemid (10 µg/ml). Astupați ermetic eprubetele și amestecați ușor prin răsturnare.
- Incubați eprubetele la 35 - 39 °C timp de 45 de minute.
- După incubare, centrifugați eprubetele timp de 8 minute la 1.000 rpm.
- Aspirați cu atenție supernatantul din fiecare eprubetă, folosind un aspirator de vid, cu capcană de dizolvant. Aveți grijă să nu aspirați peleta.
- Resuspendați peleta de celule bătând cu degetul în partea de jos sau laterală a fiecărei eprubete.
- Porniți un cronometru de 20 de minute.
- Adăugați, picătură cu picătură, 3 - 4 ml de soluție hipotonică (0,075 M clorură de potasiu) preîncălzită (35 - 37 °C).
- Astupați ermetic eprubeta și amestecați ușor bătând cu degetul în partea de jos sau laterală a eprubetei.
- Adăugați, picătură cu picătură, 5 - 4 ml de soluție hipotonică preîncălzită (35 - 37 °C). Astupați ermetic eprubeta și apoi răsturnați-o.
- Repetăți pașii 9 - 11 pentru fiecare eprubetă.
- Folosind o baie de apă, permiteți eprubetelor să stea la 35 - 37 °C. Răsturnați eprubetele o dată la jumătatea timpului de cronometrare de 20 de minute.
- La sfârșitul perioadei de cronometrare de 20 de minute, scoateți eprubetele din baia de apă și adăugați 1 ml de fixativ Carnoy proaspăt 3:1 în fiecare eprubetă. Astupați ermetic și apoi răsturnați fiecare eprubetă. (Acesta este un pas prefixativ.)

- Centrifugați eprubetele la 1.000 rpm timp de 8 minute.

- Aspirați supernatantul din fiecare eprubetă, lăsând cam 1 ml peste peleta de celule. Aveți grijă să nu aspirați peleta. Fiți atenți la materialul fibros care este posibil să se extindă din peleta de celule în supernatant după centrifugare. Poate fi necesar să se îndepărteze ultimii câțiva mL de supernatant cu o pipetă Pasteur (fără a folosi aspirarea cu vacuum) pentru a evita aspirarea întregii pelete de celule în recipientul pentru reziduuri.

- Resuspendați peleta de celule așa cum se descrie la pasul 7.
- Adăugați, picătură cu picătură, 3 - 4 ml de fixativ Carnoy proaspăt 3:1.

- Adăugați restul de fixativ până la 7 ml.

- Repetăți pașii 16 - 19 pentru fiecare eprubetă.

- Lăsați să stea 10 minute la temperatura camerei. (Acesta este primul pas fixativ.)

- Centrifugați eprubetele la 1.000 rpm timp de 8 minute.

- Aspirați supernatantul lăsând aproximativ 1 ml deasupra peletei. Resuspendați peleta de celule.

- Adăugați fixativ până la 7 ml. Centrifugați eprubetele la 1.000 rpm timp de 8 minute. (Al doilea pas fixativ.)

- Repetăți pașii 22 - 23. (Al treilea pas fixativ.)

- În acest punct, peletele de celule fixate pot fi folosite imediat pentru pregătirea lamelor în conformitate cu protocolul standard al laboratorului sau depozitate la frigider (2 - 8 °C) sau congelatoare pentru utilizare în viitor.

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

CHANG Marrow ar trebui depozitat congelat sub –10 °C până când este gata de utilizare. CHANG Marrow este stabil până la data de expirare indicată pe eticheta flaconului când este depozitat congelat. După dezghețare, orice produs neutilizat poate fi transferat în părți alicote de lucru și recongelat pentru utilizare ulterioară sau închis ermetic și depozitat la o temperatură de 2 - 8 °C timp de până la 30 de zile. Protejați de lumina fluorescentă.

PRECAUȚII ȘI AVERTISMENTE

Acest dispozitiv este conceput pentru a fi utilizat de către personal instruit în proceduri care includ întrebuințarea pentru care a fost conceput dispozitivul.

CHANG Marrow conține mediu condiționat FBS și GCT și ar trebui manipulat cu precauții universale pentru laborator. Mediul conține un antibiotic (sulfat de gentamicină) pentru a se reduce potențialul de contaminare bacteriană, dar ar trebui folosite întotdeauna tehnici aseptice la transferarea mediului. Nu folosiți niciun mediu care nu are culoarea roșie.

SVENSKA

INDIKATIONER

CHANG Marrow är avsett för användning vid primärodling av kliniska humana benmärgskulturer för karyotyp-bestämming och andra genetiska tester av olika hematologiska störningar.

PRODUKTBESKRIVNING

CHANG Marrow är ett medium som är färdigt att användas och består av IMDM med FBS, HEPES-buffert, L-glutamin, GCT-konditionerat medium (Giant Cell Tumor), rekombinant humant GM-CSF samt gentamicinsulfat. CHANG Marrow har optimerats för att främja en effektiv växt av benmärgsceller för cytogenetiska analyser. Inga andra komponenter behöver tillsättas före odling av benmärg. CHANG Marrow innehåller gentamicinsulfat (50 mg/l). Ytterligare antibiotika kan tillsättas om så önskas.

KOMPONENTER

<u>Aminosyror</u>	<u>Proteiner, hormoner, samt tillväxtfaktorer</u>	<u>Antibiotikum</u>
Alanin	Fetalt bovint serum	Gentamicinsulfat
Arginin	(FBS)	<u>Övrigt</u>
Asparagin	hrGM-CSF	Biotin
Asparaginsyra		GCT-konditionerat medium (Giant cell tumor, GCT-CM)
Cystin		<u>Salter och joner</u>
Glutaminsyra	Natriumklorid	Natriumselenit
Glutamin	Glycin	Kalciumklorid
Glycin	Histidin	Kolinklorid
Histidin	Isoleucin	Kaliumklorid
Isoleucin	Leucin	Folsyra
Leucin	Lysin	Kaliumnitrat
Lysin	Metionin	Magnesiumsulfat
Metionin	Fenylalanin	Natriumfosfat
Prolin		<u>Bufferlar</u>
Serin	Treonin	Natriumbikarbonat
Treonin	Tryptofan	HEPES
Tryptofan	Tyrosin	<u>Vatten</u>
Valin	Valin	Vatten för injektion (WFI)
	<u>Energisubstrat</u>	
	Glukos	
	Pyruvat	
	Inositol	

KVALITETSSÄKRING

Ett flertal faktorer, inklusive provernas ursprung, odlingsförhållanden och val av reagenser kan påverka de resultat som erhålls. Vi rekommenderar användare att före rutinmässig användning köra varje ny reagensbatch parallellt med referensmaterial av känd, lämplig aktivitet. Prestandan hos varje lot av CHANG Marrow har testats på kliniska benmärgskulturer vid ett oberoende kliniskt cytogenetiskt laboratorium, och jämförts med ett kontrollmedium. Resultaten finns rapporterade på ett lotspecifikt analyscertifikat (Certificate of Analysis).

MATERIAL OCH UTRUSTNING SOM KRÄVS MEN INTE MEDFÖLJER

- Sterila centrifugrör av plast och odlingsflaskor
- CO₂-inkubator, 37 °C
- Bänkcentrifug
- Vortexblandare
- Colcemid stamlösning, 10 µg/ml
- Kaliumkloridlösning, 0,075 M
- Fixeringslösning, metanol:ättiksyra (3:1)

BEREDNING FÖR ANVÄNDNING

Tina mediet över natten i kylskåp (2–8 °C) och blanda det sedan försiktigt för att säkerställa att det är homogent. Dispensera aseptiskt 10 ml medium i sterila odlingsflaskor och ekvibrera till 37 °C för omedelbar användning.

BRUKSANVISNING

I. Provberedning:

Använd 0,5–1,0 ml benmärgsasspirat hepariniserat med natriumheparin. Litiumheparin, EDTA eller citrathaltiga antikoagulantia är olämpliga för cytogenetiska undersökningar.

- Om mer än 5 ml benmärgsasspirat erhålls kan provet vara upplandat med blod. Centrifugera ned provet vid 1 200 rpm under 8 minuter för att isolera benmärgsfraktionen.

- Om provet anländer i transportmedium, centrifugera ned provet vid 1 200 rpm under 8 minuter och avlägsna transportmediet (supernatanten). Använd den kvarvarande nedcentrifugerade fraktionen i botten av röret för utsädd.

För ytterligare information om användning av dessa produkter bör varje laboratorium konsultera sina egna laboratorieförfaranden och -protokoll som utvecklets och optimerats särskilt för det egna medicinska programmet.

II. Benmärgsodling:

Märk alla odlingskärl med patientens namn, provnummer och typ av kultur.

- Låt CHANG Marrow uppnå rumstemperatur före utsädd av provet.
- Inokulera varje kultur med en lämplig mängd prov så att en optimal koncentration på 1 x 10⁶ celler/ml eller 10 x 10⁶ celler per 10 ml kultur uppnås.
- Varje enskilt laboratorium bör fastställa antalet kulturer som ska förberedas beroende på den kliniska indikationen. Ytterligare tillväxtfaktorer kan tillsättas om så önskas.
- Incubera kulturerna vid 35–39 °C, 5–8 % CO₂-atmosfär tills de är klara att sköras.

Skörda kulturerna:

- Ta ut kulturen som är klar att sköras ur inkubatorn och snurra flaskan försiktigt så att cellerna resuspenderas.
- Överför varje flaskas innehåll till ett 15 ml centrifugrör.
- Tillsätt 40 µl Colcemid-stamlösning (10 µg/ml) till varje rör med kultur. Förslut rören noga och blanda försiktigt genom vändning.
- Incubera rören vid 35–39 °C i 45 minuter.
- Centrifugera rören efter inkuberingen i 8 minuter vid 1 000 rpm.
- Aspirera supernatanten försiktigt från varje rör med hjälp av en vakuumsug med lösningsmedelsfälla. Undvik noga att aspirera upp pelleten.
- Resuspendera cellpelleten genom att knäppa med fingret på botten eller sidan av varje rör.
- Ställ en tidtagare på 20 minuter.
- Tillsätt droppvis 3–4 ml förvärmd (35–37 °C) hypoton lösning (0,075 M kaliumklorid).
- Förslut röret noga och blanda försiktigt genom att knäppa med fingret på rörets botten eller sida.
- Tillsätt droppvis 5–6 ml förvärmd (35–37 °C) hypoton lösning. Förslut röret noga och vänd det.
- Upprepa steg 9–11 för varje rör.

- Låt rören stå i ett vattenbad vid 35–37 °C. Vänd rören en gång mitt i 20-minutersperioden.
- När 20-minutersperioden är till ända, ta upp rören ur vattenbadet och tillsätt 1 ml färsk 3:1 Carnoys fixeringslösning till varje rör. Förslut varje rör noga och vänd det. (Detta är pre-fixeringslösnngssteget).
- Centrifugera rören i 8 minuter vid 1 000 rpm.

- Aspirera supernatanten från varje rör men lämna kvar cirka 1 ml ovanför cellpelleten. Undvik noga att aspirera upp pelleten. Undvik fibröst material som eventuellt kan sticka upp ur cellpelleten in i supernatanten efter centrifugering. De sista få millilitrarna supernatant kan behöva avlägsnas för hand med hjälp av en Pasteurpipett (vakuumaspirera ej) så att man undviker att aspirera upp hela cellpelleten i avfallsbehållaren.
- Resuspendera cellpelleten enligt beskrivningen i steg 7.
- Tillsätt droppvis 3–4 ml färsk 3:1 Carnoys fixeringslösning.
- Tillsätt återstående fixeringslösning till en total rörvolym på upp till 7 ml.

- Upprepa steg 16–19 för varje rör.

- Låt stå i 10 minuter vid rumstemperatur. (Detta är det första fixeringslösnngssteget).

- Centrifugera rören i 8 minuter vid 1 000 rpm.

- Aspirera supernatanten men lämna kvar cirka 1 ml ovanför pelleten. Resuspendera cellpelleten.

- Tillsätt fixeringslösning till en total rörvolym på upp till 7 ml. Centrifugera rören i 8 minuter vid 1 000 rpm. (Andra fixeringslösnngssteget).

- Upprepa steg 22–23. (Tredje fixeringslösnngssteget).

- De fixerade cellpellets kan nu antingen användas omedelbart för beredning av objektglas enligt laboratoriets standardförfarande eller förvaras i kylskåp (2–8 °C) eller frys för senare användning.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

CHANG Marrow ska sköras fryst vid temperatur under –10 °C tills det skall användas. Vid frysförvaring är CHANG Marrow hållbart fram till det utgångsdatum som anges på flaskans etikett. Efter upptining kan eventuell oanvänd produkt delas upp i alkivoter och frysas på nytt för senare användning, eller förslutas tätt och förvaras vid 2–8 °C i upp till 30 dagar. Skyddas mot fluorescerande ljus.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

Denna produkt är avsedd att användas av personal med utbildning i procedurer som omfattar den indicerade tillämpning för vilken produkten är avsedd.

CHANG Marrow innehåller FBS samt GCT-konditionerat medium och ska hanteras enligt generella försiktighetsåtgärder för laboratorier. Mediet innehåller ett antibiotikum (gentamicin) för att minska risken för bakteriell kontaminering; aseptiska metoder ska dock alltid användas när mediet dispenseras. Använd inte något medium som inte har röd färg.

EESTI KEEL

NÄIDUSTUS KASUTAMISEKS

CHANG Marrow on mõeldud kasutamiseks primaarsetes kliinilistes inimese luuüdi kultuurides karütüüpimise ja muude geneetilise, erinevate hematoloogiliste häirete testimise eesmärgil.

SEADME KIRJELDUS

CHANG Marrow on kasutusvalmis sööde, mis koosneb IMDM-ist koos FBS-iga ja sisaldab HEPES-puhvrit, L-glutamiini, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Mediumi, Recombinant Human GM-CSF-i ja gentamitsiin-sulfaati. CHANG Marrow on optimeeritud toetama luuüdi rakude efektiivset kasvu tsütogeneetilise analüüsi eesmärgil. Enne luuüdi kultuurimist ei ole vaja lisada muid komponente. CHANG Marrow sisaldab gentamitsiin-sulfaati (50 mg/l). Vajaduse korral võib lisada antibiootikume.

OSAD

Aminohapped	Valgud, hormoonid ja kasvufaktorid	Antibiootikum
Alaniin		Gentamitsiinsulfaat
Arginiin	Veiselote päritolu seerum (FBS)	Muu
Asparagiin	Asparagiin	Biotiin
Asparaginhape	hrGM-CSF	Hidrakulise kasvaja
Tsistiin		põhine sööde (GCT-CM)
Glutamiinhape	Soolad ja ioonid	Vitamiinid ja mikroelemendid
Glutamiin	Naatriumkloriid	
Glütsiin	Naatrumseleniit	
Histidiin	Kaltsiumkloriid	
Isoleutsiin	Kolinkloriid	
Leutsiin	Kaaliiumkloriid	
Lüsiin	Kaaliiumnitraat	
Metioniin	Magneesiumsulfaat	
Fenüüalaniin	Naatrumsulfaat	
Proliin		
Seriin	Puhvrid	
Treonin	Naatrium-vesinikkarbonaat	
Triptofaan	HEPES	
Türosiin		
Valiin		
	<u>Energia substraadid</u>	
	Glükoos	
	Pürüvaat	
	Inositol	

KVALITEEDI TAGAMINE

Saavutatavat tulemust võivad mõjutada mitmed tegurid, sh proovide päritolu, kultuurimistingimused ja reaktiivide valik. Kasutatule soovitatakse igat uut reaktiivipartiid paralleelselt analüüsida teadaolevalt sobiva aktiivsusega võrdlusmaterjaliga, enne kui see võetakse rutinsesse kasutusse. Iga CHANG Marrow partii jõudlust on testitud kliinilistel luuüdikultuuridel sõltumatus kliinilises tsütogeneetikalaboris ja võrreldud kontrollsöötmega. Tulemused on esitatud partiispetsiifilises analüüsi-sertifikaadis.

VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID JA VAHENDID

- Plastist steriilsed tsentrifuugikatsutid ja rakukultuuri pudelid
- CO₂ inkubaator temperatuuril 37 °C
- Lauatentrifuug
- Vortex-mikser
- Colcemid Stock Solution, 10 µg/ml
- Potassium Chloride Solution, 0,075 M
- Fixative Solution, Methanol:Acetic Acid (3 : 1)

ETTEVALMISTUSED KASUTAMISEKS

Jätke ööpäevaks külmikusse (2–8 °C) sulama ja seejärel segage tasakesi, kuni kõik on ühtlaselt segunenud. Jaotage 10 ml söödett aseptiliselt steriilsetesse kultuuri rakupudelitesse ja ekvilibreeri temperatuurin 37 °C, misjärel on sööde valmis koheseks kasutamiseks.

KASUTUSJUHEND

I. Proovi ettevalmistamine

Kasutage 0,5 kuni 1,0 ml naatriumhepariniseeritud luuüdi aspiraati. Tsütogeneetilisteks uuringuteks ei sobi liitiumhepariin, EDTA ega tsitraatantikoagulandid.

- Kui võetakse üle 5 ml luuüdi aspiraati, võib proov olla hemodiluteeritud. Luuüdi fraktsiooni isoleerimiseks tsentrifuugige 1200 p/min 8 minutit.
- Kui proov jõuab transpordisöötmesse, tsentrifuugige proovi 8 minutit 1200 p/min juures ja eemaldage transpordisööde (supernatant). Inokuleerige ülejäänud tsentrifuugitud fraktsioon katsuti põhjas.

Lisateabe saamiseks nende toodete kasutamise kohta peavad laborid tutvuma oma protseduuride ja protokollidega, mis on välja töötatud ja optimeeritud spetsiaalselt nende individuaalse meditsiini-programmi jaoks.

II. Luuüdi kultuur

Sildistage kõik kultuurianumad patsiendi nime, proovi numbr ja kultuuri tüübiga.

- Enne proovi okuleerimist tehke CHANG Marrow ümbritsvea keskkonna temperatuurini.
- Okuleerige igat kultuuri sobiva proovi kogusega, et saavutada optimaalne kontsentratsioon, milleks on 1 × 10⁴ rakku/ml või 10 × 10⁴ rakku 10 ml kultuuri kohta.
- Iga laboratoorium peab kindlaks määrama kultiveeritavate kultuuride arvu olenevalt patsiendi kliinilisest näidustusest. Vajaduse korral võib lisada lisakusufaktoreid.
- Inkubeerige kultuure temperatuuril 35–39 °C, 5–8% CO₂ atmosfääris, kuni need on valmis kogumiseks.

Kultuuride kogumine

- Eemaldage inkubaatorist kogumiseks valmis olev kultuur ja loksutage tasakesi rakupudelit, et rakke uuesti suspendeerida.
- Viige iga rakupudeli sisu üle 15 ml tsentrifuugi-katsutisse.
- Lisage igasse katseklaasi 40 µl koltsemiidi põhilahust (10 µg/ml). Sulgege tihkelt katsutite korgid ja loksutage neid tasakesi korduvalt ümber pöörates.
- Inkubeerige katsuteid 45 minutit temperatuuril 35–39 °C.
- Pärast inkubeerimist tsentrifuugige katsuteid 8 minutit 1000 p/min juures.
- Aspireerige supernatant ettevaatlikult igast katsutist lahusti püüduriga vaakumpipeti abil. Olge ettevaatlik, et mitte rakupelletit aspireerida.
- Suspendeerige rakupelletit uuesti, koputades sõrmega iga katsuti põhjale või küljele.
- Käivitage 20-minutilise taimer.
- Lisage tilkhaaval 3–4 ml eelsoojendatud (35–37 °C) hüpotoonilist lahust (0,075 M kaaliiumkloriid).
- Sulgege tihkelt katsuti kork ja loksutage seda tasakesi, koputades sõrmega katsuti põhjale või küljele.
- Lisage tilkhaaval 5-6 ml eelsoojendatud (35–37 °C) hüpotoonilist lahust. Sulgege tihkelt katsuti kork ja pöörake katsuti ümber.
- Korrake samme 9–11 iga katsuti puhul.
- Laske katsutitel 35–37 °C juures veevannis seista. Pöörake katsutid 20-minutilise perioodi keskel üks kord ümber.

- 20-minutilise perioodi möödudes võtke katsutid veevannist välja ja lisage igasse katsutisse 1 ml värsket segu Carnoy's Fixative (metanooli ja äädikhappe segu suhtega 3 : 1). Sulgege tihkelt katsutite korgid ja pöörake need ümber. (Tegemist on eelkinnistava sammuga.)
- Tsentrifugeige katsuteid 8 minutit 1000 p/min juures.
- Aspireerige supernatant igast katsutist, jättes rakupelleti peale umbes 1 ml. Olge ettevaatlik, et mitte rakupelletit aspireerida. Olge ettevaatlik fibroosse materjaliga, mis võib pärast tsentrifuugimist ulatuda rakupelletist üles supernatandi sisse. Viimased paar ml supernatanti võib olla vajalik eemaldada käsitsi, kasutades Pasteuri pipetti (mitte vaakumpipettimise teel), et vältida kogu rakupelleti aspireerimist jäätmenõusse.
- Suspendeerige rakupelletit uuesti, nagu on kirjeldatud sammus 7.
- Lisage tilkhaaval 3-4 ml värsket segu Carnoy's Fixative (metanooli ja äädikhappe segu suhtega 3 : 1).
- Lisage ülejäänud segu, kuni katsuti täitub tasemeni 7 ml.
- Korrake samme 16–19 iga katsuti puhul.
- Laske 10 minutit toatemperatuuril seista. (Tegemist on esimese kinnistava sammuga.)
- Tsentrifugeige katsuteid 8 minutit 1000 p/min juures.
- Aspireerige supernatant, jättes rakupelleti peale umbes 1 ml. Suspendeerige rakupelletit uuesti.
- Lisage segu, kuni katsuti täitub tasemeni 7 ml. Tsentrifugeige katsuteid 8 minutit 1000 p/min juures. (Tegemist on teise kinnistava sammuga.)
- Korrake samme 22-23. (Tegemist on kolmanda kinnistava sammuga.)
- Pärast seda saab kinnistatud rakupelletide kasutada kas kohe slaidi ettevalmistamiseks laboratoorse standardprotokollி kohaselt või säilitada neid edaspidiseks kasutamiseks külmikus (2–8 °C) või sügavkülmas.

SÄILITAMINE JA STABIILSUS

Söödet CHANG Marrow tuleb säilitada kuni kasutamiseni sügavkülmutatult temperatuuril alla –10 °C. CHANG Marrow on juhistekohasel säilitamisel stabiilne pudeli etiketile märgitud kuupäevani. Pärast ülessulاتمist võib kasutamata toote jaotada kasutamiskõlblikeks alikvootideks ja taaskülmutada hilsemaks kasutamiseks või sulgeda tihkelt korgiga ning säilitada temperatuuril 2–8 °C kuni 30 päeva. Katske fluorestantsvalguse eest.

ETTEVAATUSABINÕUD JA HOIATUSED

See seade on ette nähtud kasutamiseks tervishoiu-töötajatele, kes on saanud koolituse selle seadme sihtotstarbelise kasutamise alal.

CHANG Marrow sisaldab FBS ja GCT põhist söödett ning seda tuleb käidelda tavapärasel laboratoorse ettevaatusabinõudega. Sööde sisaldab antibiootikumi (gentamitsiinsulfaati), et vähendada bakteriaalse saaste võimalust, kuid söõtte jaotamisel tuleb alati rakendada aseptilist tehnikat. Ärge kasutage ühtki söödett, mis ei ole punast värvi.

MAGYAR

FELHASZNÁLÁSI JAVALLATOK

A CHANG Marrow klinikai humán csontvelőtenyészetek elsődleges tenyésztésében való alkalmazásra szolgál, kariotípus meghatározásához és más genetikai vizsgálatokhoz különböző hematológiai rendelle-nességek esetén.

TERMÉKISMERTETÉS

A CHANG Marrow egy azonnal használható médium, amely FBS-t, HEPES-puffert, L-glutamint, óriássejtes tumor (giant cell tumor, GCT) kondicionált médiumot, rekombinás humán GM-CSF-et és gentamicin-szulfátot tartalmazó IMDM-ből áll. A CHANG Marrow médiumot úgy optimalizálták, hogy támogassa a csontvelősejtek hatékony növekedését a citogenetikai elemzéshez. A csontvelő tenyésztése előtt semmilyen ösztövel hozzáadása nem szükséges. A CHANG Marrow gentamicin-szulfátot (50 mg/l) tartalmaz. Szükség esetén további antibiotikumokat is hozzáadhat.

ÖSSZETEVŐK

Aminosavak	Fehérjék, hormonok és növekedési faktorok	Antibiotikum
Alaniin		Gentamicin-szulfát
Arginin		
Aszparagin	Magzati	Egyéb
Aszparaginsav	szarvasmarha szérum (fetal bovine serum, FBS)	Óriássejtes tumor kondicionált médium (giant cell tumor conditioned medium, GCT-CM)
Cisztin		
Glutaminsav	hrGM-CSF	
Glutamin		
Glicin		
Hisztidin	Sók és ionok	
Izoleucin	Nátrium-klorid	
Leucuin	Nátrium-selenit	Vitaminok és nyomelemek
Lizin	Kalcium-klorid	Folsav
Lütiin	Kolin-klorid	Nikotinamid
Metionin	Kálium-klorid	Riboflavin
Fenilalanin	Kálium-nitrát	Tiamin
Prolin	Magnézium-szulfát	Pantoténsav
Szerin	Magnézium-szulfát	Kobalamin
Treonin	Nátrium-foszfát	Piridoxin
Triptofán		
Tirozin		
Valin		
	<u>Pufferek</u>	<u>Víz</u>
	Nátrium-bikarbonát	Injekcióhoz való
	HEPES	minőségű víz
	<u>Energiasubsztátok</u>	
	Glükóz	
	Pürinát	
	Inozitol	

MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS

A kapott eredményt számos tényező befolyásolhatja, beleértve a minták forrását, a tenyésztési körülményeket és a reagensek kiválasztását. Javasoljuk, hogy a felhasználók minden új reagenstételt ismert, megfelelő aktivitási referenciaanyaggal párhuzamosan futtassanak a rutinszerű használat előtt. A CHANG Marrow minden egyes tételtől klinikai csontvelő-tenyészeteken tesztelték egy kontrollmédiummal összehasonlítva, független klinikai citogenetikai laboratóriumban. Az eredményekről jelentés készül egy tételspecifikus analitikai bizonylaton.

SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK ÉS FELSZERELÉS

- Műanyag, steril centrifugácsővek és tenyésztőflaskák
- CO₂-inkubátor, 37 °C-on
- Asztali centrifuga
- Vortex keverő
- Kolcemid törzsoldat, 10 µg/ml
- Kálium-klorid oldat, 0,075 M
- Fixálóoldat, metanol:ecetsav (3:1)

ELŐKÉSZÍTÉS A FELHASZNÁLÁSRA

Egy éjszakan át hűtőszekrényben (2–8 °C) kell felolvasztani, majd óvatosan össze kell keverni a homogenitás biztosítása érdekében. Aszeptikusan adagoljon 10 ml médiumot a steril tenyésztőflaskákba, és ekvilibrálja 37 °C-ra az azonnali felhasználáshoz.

HASZNÁLATI UTASÍTÁS

I. Minta-előkészítés:

Használjon 0,5–1,0 ml nátrium-heparinizált csontvelő-aspirátumot. A lítium-heparin, az EDTA vagy a citrát-antikoagulánsok nem alkalmasak citogenetikai vizsgálatokhoz.

- Ha 5 ml-nél több csontvelő-aspirátumot kap, előfordulhat, hogy a minta hemodilult. Pörgesse le a mintát 1200 rpm-en 8 percig a csontvelőfrakció izolálásához.
- Ha a minta transzportmédiumban érkezik, pörgesse le a mintát 1200 rpm-en 8 percig, és távolítsa el a transzportmédiumot (felüliszó). Végezze el az inokulációt a cső alján lévő maradék lepörgetett frakcióval.

A termékek használatára vonatkozó további részletekért minden laboratóriumnak a saját laboratóriumi eljárásait és protokolljait kell figyelembe vennie, amelyeket specifikusan a saját orvosi programjukhoz hoztak létre és optimalizáltak.

II. Csontvelőtenyészet:

Feliratozza az összes tenyésztőedényt a beteg nevével, a mintaszámmal és a tenyésztési típusával.

- A minta inokulációja előtt érje el, hogy a CHANG Marrow környezeti hőmérsékletű legyen.
- Inokuláljon minden tenyészetet a megfelelő mintamennyiséggel, hogy elérje az optimális 1 × 10⁴ sejtm1 vagy 10 × 10⁴ sejt/10 ml tenyészet-koncentrációt.
- Minden egyes laboratóriumnak a beteg klinikai indikációjától függően kell meghatároznia a létrehozni kívánt tenyészetek számát. Szükség esetén további növekedési faktorokat is hozzáadhat.
- Inkubálja a tenyészeteket 35–39 °C-on, 5–8%-os CO₂-atmoszférában, amíg készen nem állnak az összegyűjtésre.

A tenyészetek összegyűjtése:

- Az összegyűjtésre készen álló tenyészetet vegye ki az inkubátorból, és a sejtek újbóli felszuszpendálásához óvatosan forgassa meg a flaskát.
- Tegye át minden egyes flaska tartalmát egy-egy 15 ml-es centrifugacsőbe.
- Mindegyik tenyészetet tartalmazó csőhöz adjon 40 µl kolcemid törzsoldatot (10 µg/ml). Szorosan zárja le a csöveket, és óvatosan keverje össze tartalmukat a csövek invertálásával.
- Inkubálja a csöveket 35–39 °C-on 45 percig.
- Az inkubálás után centrifugálja a csöveket 8 percig 1000 rpm-en.
- Óvatosan szívja le a felüliszózt az egyes csövekből vákuumszivással, oldószerfogó használatával. Ügyeljen arra, hogy ne szívja le a pelletet.
- Az újjával ütögesse meg az egyes csövek alját vagy oldalát a sejtpellet újbóli felszuszpendálásához.
- Állítson be 20 perces időzítést.
- Cseppenként adjon hozzá 3–4 ml előmelegített (35–37 °C) hipotóniás oldatot (0,075 M kálium-klorid).
- Szorosan zárja le a csövet, és újjával a cső alját vagy oldalát megütögetve óvatosan keverje össze a tartalmát.

- Cseppenként adjon hozzá 5–6 ml előmelegített (35–37 °C) hipotóniás oldatot. Szorosan zárja le a csövet, majd fordítsa fel.
- Ismételje meg a 9–11. lépést mindegyik csövel.
- Vízfürdő használatával állítsa fel a csöveket 35–37 °C-on. A 20 perces időztés felénél fordítsa fel egyszer a csöveket.

- A 20 perces időszak végén vegye ki a csöveket a vízfürdőből, és adjon mindegyik csőhöz 1 ml friss, 3:1 Carnoy-féle fixálószert. Minden csövet szorosan zárjon le, és fordítsa fel őket. (Ez a fixálás előtti lépés.)

- Centrifugálja a csöveket 8 percig 1000 rpm-en.
- Szívja le a felüliszózt mindegyik csőről, körülbelül 1 ml-t hagyva a sejtpellet felett. Ügyeljen arra, hogy ne szívja le a pelletet. Ügyeljen a szálás anyagra, amely a centrifugálás után a sejtpelletből a felüliszóba kerülhet. Lehet, hogy az utolsó néhány ml felüliszót kézzel kell eltávolítani egy Pasteur-pipettával (nem vákuumszivással) a teljes sejtpellet hullékartályba szivásának elkerülése érdekében.
- Szuszpendálja fel újra a sejtpelletet a 7. lépésben leírtak szerint.
- Cseppenként adjon hozzá 3–4 ml friss, 3:1 Carnoyféle fixálószert.
- Adj a hozzá a maradék fixálót, 7 ml-ig.
- Ismételje meg a 16–19. lépést mindegyik csövel.
- Hagyja állni 10 percen át szobahőmérsékleten. (Ez az első fixálási lépés.)
- Centrifugálja a csöveket 8 percig 1000 rpm-en.
- Szívja le a felüliszózt, körülbelül 1 ml-t hagyva a pellet felett. Szuszpendálja fel újra a sejtpelletet.
- Adjon hozzá fixálót, 7 ml-ig. Centrifugálja a csöveket 8 percig 1000 rpm-en. (A fixálás második lépése.)
- Ismételje meg a 22–23. lépést. (A fixálás harmadik lépése.)
- Ekkor a fixált sejtpellettek azonnal felhasználhatók metszetkészítéshez a laboratórium standard protokollja szerint, vagy hűtőszekrényben (2–8 °C között), illetve fagyasztóban tárolhatók későbbi felhasználásra.

TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

A CHANG Marrow médiumot fagyasztva, –10 °C alatti hőmérsékleten kell tárolni a felhasználásig. A CHANG Marrow stabil az üveg címkéjén feltüntetett lejárati időpontig, amennyiben fagyasztva tárolják. A felolvasztást követően a fel nem használt termék munkaalkotokra osztható, és későbbi használatra újra lefagyasztható, illetve szorosan lezárva 2–8 °C közötti hőmérsékleten legfeljebb 30 napig tárolható. Védje a fluoreszcens fénytől.

ÖVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK

Ezt a terméket azon eljárásokban képzett személyzet által felhasználásra szánták, amelyek során a termék alkalmazása javallott.

A CHANG Marrow FBS-t és GCT-kondicionált médiumot tartalmaz, és az általános laboratóriumi óvintézkedések szerint kell kezelni. A médium antibiotikumot (gentamicin-szulfátot) tartalmaz a bakteriális szennyeződés valószínűségének csökkentése érdekében, de a médium adagolásokor mindig aszeptikus technikákat kell alkalmazni. Ne használja a médiumot, ha nem piros színű.

LIETUVIŲ K.

NAUDOJIMO INDIKACIJA

„CHANG Marrow“ terpė yra skirta pirminės klinikinės žmogaus kaulų čiulpų ląstelių kultūrosms auginti atliekant karioטיפavimo ir kitus genetinius hematologinių patologijų tyrimus.

ĮTAISO APRAŠYMAS

„CHANG Marrow“ – tai paruošta naudoti terpė, kurios sudėtyje yra IMDM terpės su FBS, HEPES buferinio tirpalo, L-glutamino, kondicionuotos terpės iš gigantinių ląstelių naviko (GCT) linijos, rekombinantinio žmogaus GM-CSF ir gentamicino sulfato. „CHANG Marrow“ terpė yra optimizuota palaikyti efektyvų kaulų čiulpų ląstelių augimą kultivuojant citogenetinėi analizei skirtas kultūras. Prieš kultivuojant kaulų čiulpų pasėlius, nereikia pridėti jokių kitų sudėtinii medžiagu. „CHANG Marrow“ terpės sudėtyje yra gentamicino sulfato (50 mg/l). Prireikus galima pridėti papildomų antibiotikų.

SUDEDAMOSIOS DALYS

Aminorūgštys	Baltymai, hormonai	Antibiotikas
Alaninas	Alaninas	Gentamicino sulfatas
Argininas	Jaučio embriono	
Asparaginas	kraujo serumas	
Asparto rūgštis	(FBS)	Kita
Cistinas	hrGM-CSF	Biotinas
Glutamo rūgštis		Kondicionuota terpė iš gigantinių ląstelių naviko (GCT-CM) linijos
Glutaminas	Druskos ir jonai	
Glicinas	Natrio chloridas	Vitaminai ir mikroelementai
Istidinas	Natrio selenitas	Folio rūgštis
Izoleucinas	Kalcio chloridas	Nikotinamidas
Leucinas	Cholino chloridas	Riboflavinas
Lizinas	Kalio chloridas	Tiaminas
Metioninas	Kalio nitratas	Pantotentinė rūgštis
Fenilalaninas	Magnio sulfatas	Kobalaminas
Prolinas	Natrio fosfatas	Piridoksinas
Serinas		
Treoninas	Buferiai	
Triptofanas	Natrio bikarbonatas	
Tirozinas	HEPES	
Valinas		
	Energetiniai substratai	Vanduo
	Glukozė	Injekcinio vandens kokybė
	Piruvatas	
	Inozitolis	

KOKYBĖS UŽTIKINIMAS

Gautiems rezultatams įtakos gali turėti keletas veiksnių, įskaitant mėginii šaltinius, kultūrų auginimo sąlygas ir reagentų pasirinkimą. Rekomenduojama prieš pradėdant kiekvienos naujos partijos reagentus naudoti reguliariai, juos pirmiausia išbandyti lyginant su tuo pat metu tiriamais pamatinės žinomo tinkamo aktyvumo medžiagos bandiniais. Kiekvienos partijos „CHANG Marrow“ terpių veikimas buvo išbandytas auginant klinikinės kaulų čiulpų ląstelių kultūras nepriklausomoje klinikiinių citogenetinių tyrimų laboratorijoje ir lyginant su kontrole terpė. Rezultatai pateikiami atskiroms partijoms parengtuose analizės sertifikatuose.

REIKALINGOS, BET PAKUOTĖJE NEPAATEIKTOS MEDŽIAGOS IR ĮRANGA

- Steriliūs plastikiniai centrifuginiai mėgintuvėliai ir kultivavimo flakonai
- CO₂ inkubatorius 37 °C temperatūroje
- Stalinė centrifuga
- Sūkurinė maišyklė
- Kobalio druginis tirpalas, 10 µg/ml
- Kalio chlorido tirpalas, 0,075 M
- Fiksatyvo tirpalas, metanolis: acto rūgštis (3:1)

PARUOŠIMAS NAUDOTI

Per naktį atitirpinkite šaldytuve (2–8 °C), po to atsargiai sumaišykite iki vienalytės konsistencijos. Laikydamiasei aseptikos reikalavimų, po 10 ml terpės supilstykite į sterilius pasėlio flakonus ir, nusistovėjus iki 37 °C būsenos, tuoj pat naudokite.

NAUDOJIMO NURODYMAI

I. Mėginii ruošimas

Mėginius ruoškite iš 0,5–1,0 ml kaulų čiulpų aspirato, heparinizuoto natrio heparinu. Ličio heparinas, EDTA ar citratiniai antikoagulantai citogenetiniams tyrimams netinka.

- Jei paimta daugiau kaip 5 ml kaulų čiulpų aspirato, mėginys gali būti paveiktas hemodiliucijos. Mėginį 8 min. centrifuguokite esant 1200 aps./min atskirdami kaulų čiulpų frakciją.
- Jei mėginys pristatomas transportavimo terpėje, mėginį 8 min. centrifuguokite 1200 aps./min. greičiu ir nusiurbkite transportavimo terpę (viršnuosėdinį skystį). Pasėlį užsėkite po centrifugavimo mėgintuvėlio dugne nusėdusią frakciją.

Išsamesnių šių produktų naudojimo gairių kiekviena laboratorija turi iškoti savo vidaus darbo tvarkos taisyklėse ir metodiniuose nurodymuose, specialiai parengtuose ir optimizuotuose pagal atskiros medicininės programos nuostatas.

II. Kaulų čiulpų ląstelių kultūra

Ant visų kultivavimo indų pažymėkite paciento pavardę, mėginio numerį ir kultūros tipą.

- Prieš mėginio inokuliovimą sušildykite „CHANG Marrow“ iki aplinkos temperatūros.
- Kiekviena pasėlį užsėkite atitinkamu mėginio kiekiu, kad pasiekumėtė optimalią 1 x 10⁶ ląstelių/ml arba 10 x 10⁶ ląstelių 10-yje ml pasėlio koncentraciją.
- Kiekviena laboratorija turi nustatyti, kokį skaičių pasėlių paruošti, tai priklauso nuo paciento klinikinės indikacijos. Prireikus galima pridėti papildomų augimo faktorių.
- Inkubuokite pasėlius 35–39 °C temperatūroje, 5–8 % CO₂ aplinkoje, kol bus galima paimti.

Kultūrų surinkimas

- Išimkite paimti paruoštą pasėlį iš inkubatoriaus ir švelniai pamaišykite flakoną, kad resuspenduotumėtė ląstesles.
- Kiekvieno flakono turinį perpilkite į 15 ml talpos centrifuginį mėgintuvėlį.
- Į kiekvieną pasėlio mėgintuvėlį įlašinkite po 40 µl pradinio kolcemido tirpalo (10 µg/ml). Mėgintuvėlius sandariai uždarykite dangteliais ir vartydami švelniai sumaišykite turinį.
- Mėgintuvėlius inkubuokite 45 minutes 35–39 °C temperatūroje.
- Po inkubacijos mėgintuvėlius 8 minutes centrifuguokite 1000 apsisukimų per minutę greičiu.
- Atsargiai iš kiekvieno mėgintuvėlio įsiurbkite viršnuosėdinį skystį, naudodami vakuuminį įsiurbimo įtaisą su tirkpiklio gaudykle. Būkite atsargūs ir neįsiurbkite ląstelių nuosėdų.
- Resuspenduokite ląstelių nuosėdas, pirštu baknodami kiekvieno mėgintuvėlio dugną arba šoną.
- Įjunkite 20 minučių laikmatį.
- Įlašinkite 3–4 ml pašildyto (35–37 °C) hipotoninio tirpalo (0,075 M kalio chlorido).
- Sandariai dangteliu uždarykite mėgintuvėlį ir švelniai sumaišykite pirštu baknodami mėgintuvėlio dugną arba šoną.
- Įlašinkite 5–6 ml pašildyto (35–37 °C) hipotoninio tirpalo. Sandariai uždarykite mėgintuvėlį dangteliu ir jį apverskite.
- Kiekvienam mėgintuvėliui pakartokite 9–11 veiksmus.
- Palikite mėgintuvėlius vandens vonelėje 35–37 °C temperatūroje. Vieną kartą apverskite mėgintuvėlius praėjus pusei 20 minučių laikotarpiu.

- Pasibaigus 20 minučių laikotarpiui, išimkite mėgintuvėlius iš vandens vonelės ir į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinkite 1 ml šviežio Karnojaus fiksacinio tirpalo santykiu 3:1. Kiekvieną mėgintuvėlį sandariai uždarykite dangteliu ir apverskite (tai yra veiksmas prieš fiksavimą).

- Mėgintuvėlius 8 minutes centrifuguokite 1000 aps./min. greičiu.
- Iš kiekvieno mėgintuvėlio įsiurbkite viršnuosėdinį skystį, palikdami mažiaug 1 ml virš ląstelių nuosėdų. Būkite atsargūs ir neįsiurbkite ląstelių nuosėdų. Reikia būti atsargiems, nes po centrifugavimo į viršnuosėdinį skystį iš nusėdusių ląstelių gali būti nusitęsusių skaidulinių medžiagu. Paskutinius kelis supnatanto mililitrus galį tekti nusiurbti Pastero pipete (nenaudojant vakuuminio siurbimo), kad į atliekų konteinerį nebūtų įsiurbta visa ląstelių nuosėdų masė.
- Ląstelių nuosėdas resuspenduokite, kaip aprašyta 7 veiksme.

- Įlašinkite 3–4 ml šviežio Karnojaus fiksacinio tirpalo santykiu 3:1.
- Pridėkite likusį fiksacinį tirpalą (ne daugiau kaip 7 ml).
- Kiekvienam mėgintuvėliui pakartokite 16–19 veiksmus.
- Palikite 10 minučių kambario temperatūroje (tai yra pirmas fiksavimo veiksmas).
- Mėgintuvėlius 8 minutes centrifuguokite 1000 aps./min. greičiu.
- Nusiurbkite viršnuosėdinį skystį, palikdami apie 1 ml virš ląstelių nuosėdų. Resuspenduokite ląstelių nuosėdas.
- Pridėkite fiksacinį tirpalą (ne daugiau kaip 7 ml). Mėgintuvėlius 8 minutes centrifuguokite 1000 aps./min. greičiu (antras fiksavimo veiksmas).
- Pakartokite 22–23 veiksmus (trečias fiksavimo veiksmas).
- Šitaip užfiksuotas ląstelių nuosėdas galima naudoti tuoj pat tepinėlių preparatams ruošti laboratorijoje nustatyta standartine tvarka arba galima laikyti šaldytuve (2–8 °C) ar šaldiklyje vėlesniems tyrimams.

LAIKYMAS IR STABILUMAS

Iki naudojimo „CHANG Marrow“ terpę reikia laikyti užšaldytą žemesnėje kaip –10 °C temperatūroje. Laikant užšaldytą, „CHANG Marrow“ terpė išlieka stabili iki tinkamumo datos, pažymėtos butelio etiketėje. Atitirpinus, nesunaudotą gaminio likutį galima išpilstyti darbinėmis dalimis ir vėl užšaldyti vėlesniam naudojimui arba sandariai uždengus laikyti 2–8 °C temperatūroje iki 30 dienų. Saugoti nuo fluorescencinių spindulių.

ATSARGUMO PRIEMONĖS IR ĮSPĖJIMAI

Ši priemonė yra skirta naudoti darbuotojams, išmokytiems atlikti procedūras, susijusias su priemonės taikymu pagal numatytą paskirtį.

„CHANG Marrow“ terpės sudėtyje yra FBS ir GCT kondicionuotos terpės, todėl su ja dirbant reikia imtis įprastinių laboratorinės praktikos atsargumo priemonių. Terpės sudėtyje yra antibiotiko (gentamicino sulfato), skirto bakterinio užkrėtimo pavojii sumažinti, bet išplstant terpę visuomet būtina laikytis metodinių aseptikos reikalavimų. Negalima naudoti jokios terpės, jei ji nėra raudonos spalvos.

TURŪKŲ

KULLANIM ENDİKASYONU

CHANG Marrow çeşitli hematolojik bozuklukların karyotiplemesi ve diğer genetik testler için yapılan klinik İnsan Kemik iliği Kültürlerinde primer kültür için kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

ÇİHAZ TANIMI

CHANG Marrow, FSS, HEPES tamponu, L-glutamin, Dev Hücreli Tümrör (GCT) Koşullandırılması Vasat, Rekombinant İnsan Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF) ve Gentamisin Sülfatı IMDM'den oluşan, kullanıma hazır bir vasattır. CHANG Marrow sitogenetik analiz için kemik iliği hücrelerinin etkin üremesini desteklemek üzere optimize edilmiştir. Kemik iliği kültürünün yapılmasından önce herhangi bir bileşen eklenmesi gerekmez. CHANG Marrow, Gentamisin Sülfat (50 mg/L) içerir. İstenirse ek antibiyotikler eklenebilir.

BİLEŞENLER

Amino Asitler	Proteinler, Hormonlar ve Büyüme Faktörleri	Antibiyotik
Alanin	Fetal siğir serumu (FSS)	Gentamisin Sülfat
Asparajin	hrGM-CSF	Diğer
Aspartik Asit		Biyoitin
Sistin		Dev hücreli tümrör
Glutamik Asit	Tuzlar ve İyonlar	koşullandırılmış vasat (GCT-CM)
Glutamin	Sodyum klorür	
Glisin	Sodyum selenit	
Histidin	Kalsiyum klorür	Vitaminler ve eser elementler
Izoloşin	Kolin klorür	Folik asit
Lösin	Potasyum klorür	Nikotinamid
Lizin	Potasyum nitrat	Riboflavin
Metiyonin	Magnezyum sülfat	Tiyamin
Profilanin	Sodyum fosfat	Pantotetik asit
Serin	Tamponlar	Kobalamin
Treonin	Sodyum bikarbonat	Pridoksin
Triptofan	HEPES	
Tirozin		Su
Valin	Enerji Substratları	Enjeksiyonluk Su Kalitesi
	Glukoz	
	Piruvat	
	Inositol	

KALİTE GÜVENCE

Numuneler, kültür koşulları ve reaktiflerin seçimi dahil birkaç faktör elde edilen sonucu etkileyebilir. Kullanıcıların rutin kullanıma sokmadan önce her yeni reaktif partisini bilinen uygun aktiviteye sahip referans materyalela birlikte çalışmaları önerilir. Her CHANG Marrow lotu başımsız bir Klinik Sitogenetik Laboratuvarda bir kontrol vasatıyla karşılaştırılarak Klinik Kemik iliği Kültürlerinde performans testinden geçmiştir. Sonuçlar lota özel bir Analiz Sertifikasında bildirilir.

GEREKLİ AMA SAĞLANAMAYAN MATERYAL VE EKİPMAN

- Plastik Steril Santrifüj Tüpleri ve Kültür Flaskları
- 37°C'de CO₂ İnkübatörü
- Tezgah Santrifüjü
- Vorteks Karıştırıcı
- Colcemid Stok Solüsyonu, 10 µg/mL
- Potasyum Klorür Solüsyonu, 0,075 M
- Fiksatif Solüsyon, Metanol: Asetik Asit (3:1)

KULLANIM HAZIRLIĞI

Bir buzdolabında (2 - 8°C) gece boyunca çözün ve sonra homojenliği sağlamak üzere yavaşça karıştırın. Steril kültür flasklarına aseptik olarak 10 mL vasat koyun ve hemen kullanın için 37°C'ye dengeleyin.

KULLANMA TALİMATI

1. ÖrneK Hazırlama:

0,5 - 1,0 mL sodyum heparinize kemik iliği aspiratı kullanın. Lityum heparin, EDTA veya sitrat antikoagulanları sitogenetik çalışmalar için uygun değildir.

- 5 mL üzerinde kemik iliği aspiratı alınırsa örnekte hemodilüsyon olabilir. Kemik iliği fraksiyonunu izole etmek için numuneyi 8 dakika boyunca 1200 devir/dk hızında santrifüleyin.

- Numune eğer transfer vasatında gelirse örneği 1200 devir/dk hızında 8 dakika santrifüleyip transfer vasatını (supernatan) alın. Tüpün altında kalan santrifüje edilmiş fraksiyonu kullanarak inokülasyon yapın.

Bu ürünlerin kullanımı hakkında ek ayrıntılar açısından her laboratuvar kendi ayrı tıbbi programız için özel olarak geliştirilmiş ve optimize edilmiş, kendi laboratuvar işlemleri ve protokollerine başvurmaldır.

II. Kemik İliği Kültürü:

Tüm kültür kaplarını hasta adı, numune numarası ve kültür tipliyle etiketleyin.

- Numune inokülasyonundan önce CHANG Marrow ürününü ortam sıcaklığına getirin.
- Her kültüre 1x10⁶ hücre/mL veya 10 mL kültür başına 10x10⁸ hücre şeklinde optimum bir konsantrasyon elde etmek üzere uygun miktarda örnek inokülasyonu yapın.
- Her ayrı laboratuvar hastanın klinik endikasyonuna göre kurallacak kültür sayısını belirlemelidir. İstenirse ek büyüme faktörleri eklenebilir.
- Toplamaya hazır oluncaya kadar kültürleri 35°C - 39°C'de %5 - %8 CO₂ atmosferi altında inkübe edin.

Kültürlerden Toplama:

- Toplamaya hazır kültürü inkübatörden çıkarın ve hücrelerin tekrar süspansiyonu için flaskı yavaşça çevirin.
- Her flaskın içerğini bir 15 mL santrifüj tüpüne aktarın.
- Her kültür tüpüne 40 µL stok Colcemid (10 µg/mL) ekleyin. Tüplerin kapağını sıkıca kapatın ve ters düz ederek yavaşça karıştırın.
- Tüpleri 35°C - 39°C'de 45 dakika inkübe edin.
- İnkübasyondan sonra tüpleri 8 dakika boyunca 1000 devir/dk hızında santrifüleyin.
- Her tüpten süpernatanı solvent tuzaklı bir vakumlu aspiratör kullanarak dikkatle aspire edin. Pelleti aspire etmemeye dikkat edin.
- Hücre pelletini her tüpün altına ve yan tarafına parmağınızla vurarak tekrar süspansiyon haline getirin.
- 20 dakikalık bir zamanlayıcı başlatın.

- 3 - 4 mL önceden ısıtılmış (35 - 37°C) hipotonik solüsyon (0,075 M Potasyum Klorür) ekleyin.
- Tüpün kapağını sıkıca kapatın ve tüpün altına ve yan tarafına parmağınızla vurarak yavaşça karıştırın.
- 5 - 6 mL önceden ısıtılmış (35 - 37°C) hipotonik solüsyonu damla damla ekleyin. Kapağını sıkıca kapatıp tüpü ters düz edin.
- Her tüp için 9 - 11. adımları tekrarlayın.
- Bir su banyosu kullanarak tüpleri 35 - 37°C'de dik tutun. 20 dakikalık zamanlayıcının orta noktasında tüpleri bir kez ters düz edin.
- 20 dakika zamanlayıcı bittğinde tüpleri su banyosundan çıkarın ve her tüpe 1 mL taze 3:1 Carnoy's Fixative ekleyin. Kapağını sıkıca kapatıp her tüpü ters düz edin. (Bu Prefiksatif adımıdır)

- Tüpleri 8 dakika boyunca 1000 devir/dk hızında santrifüleyin.
- Her tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelletinin üzerinde yaklaşık 1 mL bırakın. Pelleti aspire etmemeye dikkat edin. Santrifülemeden sonra hücre pelletinden yukarıya süpernatanı içine uzanabilecek fibröz materyal açısından dikkatli olun. En son birkaç süpernatanın tüm hücre pelletinin atık kabına aspirasyonundan kaçınmak üzere bir Pasteur pipetiyle (vakum aspirasyonu kullanmadan) alınması gerekebilir.

- Hücre pelletini 7. Adımda tanımlandığı gibi tekrar süspansiyon haline getirin.

- 3 - 4 mL taze 3:1 Carnoy's Fixative ürününü damla damla ekleyin.

- Kalan fiksatifı 7 mL toplam hacme kadar ekleyin.
- Her tüp için 16 - 19. adımları tekrarlayın.
- Oda sıcaklığında 10 dakika bırakın. (Bu Birinci fiksatif adımıdır).
- Tüpleri 8 dakika boyunca 1000 devir/dk hızında santrifüleyin.

- Süpernatanı aspire edip pellet üzerinde yaklaşık 1 mL bırakın. Pelleti tekrar süspansiyon haline getirin.
- 7 mL toplam hacme kadar fiksatif ekleyin. Tüpleri 8 dakika boyunca 1000 devir/dk hızında santrifüleyin. (İkinci fiksatif adımı).

- 22 - 23. adımları tekrarlayın. (Üçüncü fiksatif adımı).

- Bu noktada sabit hücre pelletleri laboratuvarın standart protokolüne göre lam hazırlama için hemen kullanılabilir veya gelecekte kullanın için buzdolabında (2°C - 8°C) veya dondurucuda saklanabilir.

SAKLAMA VE STABİLİTE

CHANG Marrow kullanıma hazır olana kadar –10°C'nin altında dondurulmuş şekilde saklanmalıdır. CHANG Marrow dondurulmuş olarak muhafaza edildiğinde şişe etiketinde gösterilen son kullanma tarihine kadar stabildir. Gözdükten sonra kullanılmamış herhangi bir ürün çalışma alitoklarına atılarak daha sonra kullanılmak üzere tekrar dondurulabilir veya kapağı sıkıca kapatılıp 2 - 8°C'de 30 güne kadar saklanabilir. Floresan ışıktan koruyun.

ÖNLEMLER VE UYARILAR

Bu cihazın, cihaz kullanımının amaçlanmış olduğu belirtilen uygulamanın dahil olduğu işlemler konusunda eğitimli personelce kullanılması amaçlanmıştır.

CHANG Marrow, FSS ve dev hücreli tümrör koşullandırılması vasat içerir ve evrensel laboratuvar önlemlerine göre kullanılmaldır. Vasat, bakteriyel kontaminasyon potansiyellni azaltmak için antibiyotik (gentamisin sülfat) içerir ama vasatı verirken daima aseptik teknikler kullanılmalıdır. Kırmızı renkte olmayan herhangi bir vasatı kullanmayın.

INDIKÁCIA NA ПОУЖИТИЕ

CHANG Marrow je učенé на поужитиe при примáрnej култивáциj клиничкýх култур лудскеj костnej дреne на карыотроповáние а инé генетичéскé тесты на гематологичéскé поручы.

ПОПИС ЗАРИАДЕНИЯ

CHANG Marrow je мéдиум урчéнé на приáме поужитиe обсажуýщe IMDM, s FBS, пуфром HEPES, L- glutaminom, мéдиум управлeнýм вéлkobункoвýм кáрциномóм (GCT), rekombinantнýм лудскýм GM-CSF а gentamicin-сулфáтoм. CHANG Marrow je оптимáлизoвáнé на подпору úчíннoгo рáсту бунiek костnej дреne на цýтoгенетичéскý аналýзу. Пред култивáциoу костnej дреne сá неvýзàдуje придáние зiаднýх кoмпoнeнтoв. CHANG Marrow обсажуe gentamicinсулфáт (50 mg/l). Ак хoчeтe, мoжнo придáт дáлшe антибиотикá.

ЗЛОЖКЫ

<i>Aминoкиселинy</i>	<i>Бeлкoвинy</i>	<i>Антибиотикум</i>
alanin	<i>а растoвé фактoры</i>	gentamicinсулфáт
arginin	fetálne бoвиннé	
asparagin	sérum (FBS)	<i>инé</i>
киселина	hrGM-CSF	biotin
аспарагoвá		мéдиум управeнé
cystin	<i>Сoли а iонý</i>	вéлkobункoвýм
киселина glutámовá	chlorid соднý	карциномóм
glutamin	seleničnin соднý	(GCT-CM)
glycin	кислoтa вáпeнатý	
histidin	cholín вáпeнатý	<i>Витáминy</i>
izoleucin	chlorid дрacлeнý	<i>а стoпoвé</i>
leucin	дyшicан дрacлeнý	киселина listовá
lyzin	sirán хoрeчнaтý	nikotinamid
metionin	tóstát соднý	iboflavín
fenýlalanin		tiámín
prolin	<i>Путре</i>	киселина
serin	hydrogénúhličitan	panoténová
treonin	соднý	kobalamin
tryptofán	HEPES	pyridoxin
tyrozín		
valin	<i>Енергетичéскé субстрáты</i>	<i>Вoдa</i>
	glukóзa	квалитá вoды
	pyрuvát	на инeкциu
	иноситол	

КОНТРОЛНА КАЧАЛИТА

Виáчeрé фактoры, вратáне здрoя зoрiкe, пoдмeнoк култивáциe а вýбeру реáгeнциj, мoжý oвпýлнit зiсáныý рýслeдoк. Пoужитeлeм сá oпoрýчá, aбы кáждý нoвý шáрзу реáгeнциe спýстили парaлeлнe с рeфeрeнчнýм мaтeриáлoм знáмeй вхoднeй áктивнoй прeдтýм, нeж ю зaчýнú бeжнe пoуживáт. Кáждá шáрзa CHANG Marrow мaлa вýскýшáнý вýкoн нa клиничкýх културáх лудскеj дреne в нeзáвислoм лaбoрaтoриý прe клиничкý цýтoгенeтикoу пoрoвнáним с кoнтрoлнýм мeдиум. Вýслeдкy сá зaзaмeнáвáнý на certifikát аналýзý прe шeпeцикý шáрзу.

ВЫЖАДОВАНÉ, NO НЕДОДАВÁНÉ МАТЕРИАЛÝ А ВYБАВEНИE

- Плaстoвé стерилнé скýмкaвы нa oдстрeждoвáниe а флáстичкa нa културu
- Инкубáтoр CO₂ при тeплoтe 37 °C
- Лaбoрaтoрнá oдстрeдвикa
- Вирýý миксér
- Кмeшoвý рoзтoк Colcemid, 10 µg/ml
- Рoзтoк chloridу дрacлeнéго, 0,075 M
- Fixáчнý рoзтoк, метanol : кýсeлинa oцoвá (3:1)

ПРИПРАВА НА ПОУЖИТИЕ

Рoзмрaзтe чeз нoц в хлaдничкe (2 °C – 8 °C), пoтoм злáжкa прeмиeшáйтe, aбы сá зaиcтлá хoмoгéннoст. Асeптичý нaдáвкýйтe 10 ml мeдиá до стерилнýх флáстичéк нa културu а устáлтe нa тeплoтy 37 °C нa oкáмзитé поужитиe.

НАВОД НА ПОУЖИТИЕ

I. Приправа вoзкoры:

Пoужитe 0,5 áз 1,0 ml аспирátу костnej дреne oшeтрeнéго heparinом соднýм. Lítium heparin, EDTA aлeбo цитрátовé антикоагулaнциá сý нeвхoднé нa цýтoгенетичéскé штúдiе.

- Ак дoстaнeтe виáч нeж 5 ml аспирátу костnej дреne, вoзкoрa мoжé быт зiрeднeнá крoвy. Вoзкoрu oдстрeждýтe при 1 200 oтáчoк зa минýтu 8 минýт, aбы сá изoлoвáлa фракциá костнýх дреne.
- Ак вoзкoрa придé в прeнoснoм мeдиý, oдстрeждé ю при 1 200 oтáчoк зa минýтu 8 минýт а oдстрáйтe прeнoснé мeдиум (supernatant). Зaоужитe сá пoужитýм зvýшнéго oдстрeдeнeй фракциe нa спoкду скýмкaвы.

Дáлшe пoдpoбнoсти o поужитиý тýчтoв прoдуктoв бý мaлo кáждé лaбoрaтoриýм чeрпáт зo свoйчх влáстнýх лaбoрaтoрнýх пoстýпoв а прoтoкoлoв, кoрé бoл шeпeцифкý вýпрaчoвáнé а оптимáлизoвáнé прe вáш индиvидуáлнý медицинскý прoгрaм.

II. Култивáциá костnej дреne:

Вшeткý нaдoбы с културáми oзнáчeтe мeнoм пaциeнтa, цýслoм вoзкoры а тýпoм културy.

- Пред нaoчкoвáним вoзкoры CHANG Marrow вýтeмпeрeйтe нa oкoлитý тeплoтy.
- Кáждý културu нaoчкýйтe пpимeрaнýм мнoжýствoм вoзкoры, aбы сá дoсiáлá oптимáлнá кoнцeнтрáциá 1 x 10⁶ бунiek/ml aлeбo 10 x 10⁶ бунiek нa 10 ml културy.
- Кáждé eднoтлivé лaбoрaтoриýм si мá урчít пoчeт култур нa стaнoвeниe пoдлá клиничкé индикáциe пaциeнтa. Ак хoчeтe, мoжнo придáт дáлшe растoвé фактoры.
- Културy инкубуйтe при тeплoтe 35 °C – 39 °C, в атмoсфeрe 5 – 8 % CO₂, кýм нiе сý пpипрaвeнé нa збeр.

Збeр култур:

- Културy пpипрaвeнé нa збeр вýбeртe з инкубáтoрa а jeмнe зaврíte флáстичкoу, aбы сá бункy ресуспeндoвaли.
- Обсáх кáждeй флáстичкý прeнeстe дo 15 ml скýмкaвы нa oдстрeждoвáниe.
- Do кáждeй скýмкaвы нa култивáциu придáйтe 40 µl кмeшoвéго Colcemidu (10 µg/ml). Нa скýмкaвы нaтeснo нaсaдйтe врчнáкý а прeмиeшáйтe вeврáтeним.
- Скýмкaвы инкубуйтe при тeплoтe 35 °C – 39 °C 45 минýт.
- По инкубáциj скýмкaвы oдстрeждýйтe 8 минýт при 1 000 oтáчoк зa минýтu.
- З кáждeй скýмкaвы пoзнoрe аспируйтe supernatant пoмoцoу вáкyумнoгo аспирátoрa с флáшoу нa зaчýйтáвaниe рoзпóшдáдa. Дáйтe пoзoр, aбы стe нeoдсáли пeлeтy.
- Бункoвú пeлeтy ресуспeндуйтe пoкпoклáним прстoм нa днo aлeбo бoк кáждeй скýмкaвы.
- Нaстaвтe чaсoвáч нa 20 минýт.
- По кvпáкчáх придáйтe 3 – 4 ml зaхриeтeго (35 °C – 37 °C) hypotonичéкéго рoзтoкy (0.075 M chloridу дрacлeнéго).
- Na скýмкaвы нaтeснo нaсaдйтe врчнáкý а злáжкa прeмиeшáйтe пoкпoклáним прстoм нa днo aлeбo бoк скýмкaвы.
- По кvпáкчáх придáйтe 5 – 6 ml зaхриeтeго (35 °C – 37 °C) hypotonичéкéго рoзтoкy. Na скýмкaвы нaтeснo нaсaдйтe врчнáк а вeврáтйтe ю.
- Крoкy 9 – 11 зoпáкуйтe прe кáждý скýмкaвы.
- Пoужитe воднý кúпeл а скýмкaвы нeчáйтe пoстáт при тeплoтe 35 °C – 37 °C. Упрoстрeд 20-минúтoвéго чaсoвaния скýмкaвы рaз вeврáтйтe.
- Na кoнцi 20-минúтoвéго чaсoвaния вýбeртe скýмкaвы з воднéго кúпeлa а дo кáждeй скýмкaвы придáйтe 1 ml чeрствéго фикáчнéго рoзтoкy Carnoy 3:1. Нaтeснo нaсaдйтe врчнáк а кáждý скýмкaвы вeврáтйтe. (Тoтo je крoк прeд фикáциoу.)

- Скýмкaвы oдстрeждýйтe 8 минýт при 1 000 oтáчoк зa минýтu.

- З кáждeй скýмкaвы аспируйтe supernatant а пoнeчáйтe áси 1 ml нaд бункoвú пeлeтoу. Дáйтe пoзoр, aбы стe нeoдсáли пeлeтy. Дáвáйтe пoзoр нa влáкнитý мaтeриáл, кoрý мoжé трéчáт з бункoвeй пeлeтy дo supernatantu пo oдстрeдeни. Пoслeднýх пáр ml supernatantu мoжé быт пoтрeбнé oдстрáнит рúчнe Pasteurovou pipetou (бeз пoужитiя вáкyумнoгo oдсáвáния), aбы сá дo oтпaдoвeй нaдoбы нeаспирoвáлa цeлá бункoвá пeлeтa.

- Бункoвú пeлeтy ресуспeндуйтe тaк, aк je пoписáнé в крoкy 7.

- По кvпáкчáх придáйтe 3 – 4 ml чeрствéго фикáчнéго рoзтoкy Carnoy 3:1.

- Придáйтe зvýшнý фикáчнý рoзтoк дo 7 ml.

- Крoкy 16 – 19 зoпáкуйтe прe кáждý скýмкaвы.

- Нeчáйтe пoстáт 10 минýт при избoвeй тeплoтe. (Тoтo je прvý фикáчнý крoк.)

- Скýмкaвы oдстрeждýйтe 8 минýт при 1 000 oтáчoк зa минýтu.

- Аспируйтe supernatant, пpичoм пoнeчáйтe áси 1,0 ml нaд пeлeтoу. Ресуспeндуйтe бункoвú пeлeтy.

- Придáйтe фикáчнý рoзтoк дo 7 ml. Скýмкaвы oдстрeждýйтe 8 минýт при 1 000 oтáчoк зa минýтu. (Дрyгý фикáчнý крoк.)

- Зoпáкуйтe крoкy 22 – 23. (Трeтi фикáчнý крoк.)

- В тoмтo бoдe мoжнo зaфикoвáнe бункoвé пeлeтy oкáмзитe пoужít нa пpипрaву склiчoк пoдлá штáндáрднéго прoтoкoлy лaбoрaтoриá aлeбo учoвaт в хлaдничкe (2 °C – 8 °C) aлeбo мрaзничкe нa бyдúчe поужитиe.

УЧOВÁВÁНИЕ А СТАБИЛITА

CHANG Marrow сá мá учoвáвáт при тeплoтe пoд –10°С, áж кýм нeбyдe пpипрaвeнé нa пoужитиe. CHANG Marrow бyдe стáбилнé áж дo дáтyмy экспирáциe вýtлáчeнéго нa oзнáчeнi флáшe, áк сá учoвáвa змрaзeнé. Po размрaзeниý вшeтoк нeпoужитý прoдукт мoжнo нaдáвкoвáт дo рaчoвнýх áлкiвoт а знoвy змрaзит нa нeскoршé пoужитиe, aлeбo тeснe нaсaдит врчнáк а учoвáвáт при тeплoтe 2 °C – 8 °C дo 30 днi. Чхрáйтe прeд fluoresceнчýм свeтлoм.

БEЗПEЧНОСТНÉ OПATPEHИЯ А ВAPOBАHИЯ

Тoтo зaриáдeниe je yрчéнé нa пoужитиe пeрсoнáлoм вýскoлeнýм нa пpoceдýры, кoрé зaхрáжáтý áпликáциy, нa кoтoрý je тoтo зaриáдeниe yрчeнé.

CHANG Marrow обсажуe мeдиум управeнé пoмoцoу FBS а GCT а мýсi сá нiм мaнипyлoвáт с пoужитиeм вéсeбoчeнýх лaбoрaтoрнýх бeзпeчнoстнýх oпaтpeнi. Мeдиум обсажуe антибиотикум (gentamicinсулфáт) нa знижeниe мoжнoсти бaктeриáлeй кoнтáминáциe, нo при дáвкoвáнi мeдиá сá вýдý мyсиa пoужít асeптичéскé тeхникy. Нeпoуживáйтe жiáднe мeдиум, кoрé нeмá чeрвeнý фaрбy.

БЪЛГАРСКИ

ПОКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

CHANG Marrow e пpeднaзнaчeнa зa изпoлзвaнe в първичнo култивирaнe нa клинични култури нa чoвeшкi кoстeн мoзък зa кapиoтипизирaнe и дpyги гeнeтични тeствaния нa рaзлични хeмaтoлoгични нapyшeния.

ОПИСАНИЕ НА ИЗДЕЛИЕТО

CHANG Marrow e гoтoвa зa yпoтpeбa cpeдa, кoятo ce съcтoи oт IMDM c FBS (фeтaлeн гoвeжди ceрyм), бyфep HEPES, L-глyтaмин, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium (кoндициoнирaнa cpeдa oт гигaнтcкoклeтъчeн тyмop (GCT)), рeкoмбинaнтeн чoвeшкi гpaнyлoцитнo-мaкpoфaгeн кoлoнии cтимулирaщ фaктop (GM-CSF) и гeнтaмидин cулфaт. CHANG Marrow e oптимизирaнa дa пoддържa eфeктивeн paстeж нa кeткити нa кoстeн мoзък зa цитoгeнeтичeн aнaлиз. He e нeoбхoдимo дoбaвянe нa кoмпoнeнти пpeди култивирaнe нa кoстeн мoзък. CHANG Marrow съдържa гeнтaмидин cулфaт (50 µg/l). Пo жeлaниe мoгaт дa бýдaт дoбaвeни дoпълнитeлни антибиoтици.

КОМПОНЕНТИ

<i>Аминокиселини</i>	<i>Прoтeини, хoрмoни и рaстeжни фaктoри</i>	<i>Антибиотик</i>
Аланин	Фетален говежди сeрyм (FBS)	Гeнтaмидин cулфaт
Аргинин	Аспарагин	
Аспарагин	аспарагинова киселина	<i>Други</i>
Аспарагинова киселина	Глутаминова киселина	Биoтин
Глутамин	Глутамин	Кoндициoнирaнa cpeдa oт гигaнтcкoклeтъчeн тyмop (GCT-CM)
Глицин	Халиев хлорид	
Хистидин	Халиев селенит	
Изoлeвцин	Халиев хлорид	<i>Витaмини и микpoвeлeмeнти</i>
Левцин	Калиев нитрат	Фoлиeвa кicелинa
Лизин	Магнезиев сулфат	Никoтинaмид
Метионин	Натриев фосфат	Рибoфлaвин
Фенилаланин		Тиaмин
Пролин	<i>Буфepи</i>	Пaнтoтeнoвa кicелинa
Серин	Натриев бикарбонат	Кoбaлaмин
Треонин	HEPES	Пиридоксин
Триптофан		
Тирозин	<i>Енергийни cубcтpaти</i>	<i>Вoдa</i>
Валин	Глюкоза	Качeствo – вoдa зa инeктирaнe
	Пируват	
	Инозитол	

КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

Нáкoлкo фaктoрa, включитeлнo изтoчникa нa cпeцимeни, съcтoяниeтo нa културитe и избoрa нa рeагeнти, мoгaт дa пoвлият нa пoлучeния рeзyлтaт. Na пoтpeбитeлитe ce прeпoрýчвa вcякa нoвa пaртидa рeагeнт дa ce изпълнявa пaрaлeлнo c рeфeрeнтeн мaтeриáл с yстaнoвeнa пoдхoдящa áктивнoст пpeди въвeждaнe в рyтинa yпoтpeбa. Вcякa пaртидa CHANG Marrow e тeствaнa зa eфeктивнoст върху клинични култури нa кoстeн мoзък в нeзaвисимa клиничнa лaбoрaтoрия пo цитoгeнeтикa cпpямo кoнтрoлнa cpeдa. Рeзyлтaтитe сá пoсoчeни в кoнкрeтния зa пaртидaтa Сeртификaт зa aнaлиз.

НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ И OБOРyДВАНЕ, КOИТО НЕ СÁ ДOCTAВEНИ

- Плaстмacoви, cтepилини, цeнтpoфyжни eпpyeткити и cлaйд-флaкoни зa култури
- CO₂ инкубaтop при 37° C
- Нaстoлнa цeнтpoфyжa
- Вихров миксeр
- Изхoдeн рaзтвoр нa кoлцeмид, 10 µg/ml
- Рaзтвoр нa кaлиeв хлopид, 0,075 M
- Фиксиращ рaзтвoр, мeтaнoл:oцeтнa кicелинa (3:1)

ПОДГОТОВКА ЗА УПОТРЕБА

Размразяте за една нoщ в хлaдилник (2° C – 8° C), слeд кoетo внимaтeлнo рaзмeceтe, зa дa пoлучитe хoмoгeннoст. Асeптичнo нaкaпeтe 10 ml oт cрeдaтa в cтepилин cлaйд-флaкoн зa култури и eквilibрирaйтe дo 37° C зa нeзaбaвнa yпoтpeбa.

УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

I. Подготoвкa нa пpoбa:

Изпoлзвáйтe 0,5 дo 1,0 ml нaтриeвo хeпapинизирaн аспирaт нa кoстeн мoзък. Литиeв хeпapин, EDTA или цитрaтин антикоагулaнти сá нeпoдхoдящи зa цитoгeнeтични изслeдвaния.

- Акo e пoлучeн пoчeвe oт 5 ml аспирaт нa кoстeн мoзък, пpoбaтa мoжe дa e хeмoдилyт (пpимecнa c кръв). Цeнтpoфyгирáйтe cпeцимeнa при 1200 rpm зa 8 минyти, зa дa изoлирaтe фpaкция зa кoстeн мoзък.
- Акo cпeцимeнът пpистигнe в тpaнcфeрнa cpeдa, цeнтpoфyгирáйтe пpoбaтa при 1200 rpm зa 8 минyти и oтстрaнeтe тpaнcпoртнaтa cpeдa (cупepнaтaнт). Инокулирaйтe, кaтo изпoлзвaтe oстaнaлaтa цeнтpoфyгирaнa фpaкция нa дънoтo нa eпpyeткaтa.

Зa дoпълнитeлни пoдpoбнoсти oтнoснo изпoлзвaнeтo нa тeзи пpoдукти вcякa лaбoрaтoрия тpябвa дa нaпpaви cпpáвкa cъc cвoитe coбcтвeни лaбoрaтopни пpoцeдyри и пpoтoкoли, кoитo cá кoнкрeтнo рaзpaбoтeни и oптимизирaни зa Вaшaтa индиvидуáлнa мeдицинcкa пpoгрaмa.

II. Културa нa кoстeн мoзък:

Обoзнaчeтe e cтикет вcички съдoвe зa култури c имeтo нa пaциeнтa, нoмepa нa cпeцимeнa и типa нa културaтa.

- Пpeди инокулaциятa нa cпeцимeнa тeмпepиpáйтe CHANG Marrow дo тeмпepaтyрaтa нa oкoлнaтa cpeдa.
- Инокулирaйтe вcякa културa c пoдхoдящo кoличeствo пpoбa, зa дa пocтигнeтe oптимáлнa кoнцeнтрaция oт 1 X 10⁶ кeткити/ml или 10 X 10⁶ кeткити нa 10 ml културa.
- Вcякa oтдeлнa лaбoрaтoрия тpябвa дa oпpeдeли брoя култури, кoитo дa пoдгoтoви, в зaвисимocт oт клиничнитe пoкaзaния нa пaциeнтa. Пo жeлaниe мoгaт дa бýдaт дoбaвeни дoпълнитeлни рaстeжни фaктoри.
- Инкубиpáйтe културитe при 35° C – 39° C, 5% – 8% CO₂ атмoсфeрa, дoкaтo cтaнaт гoтoви зa cъбиpaнe.

Събиpанe нa културитe:

- Извaдeтe гoтoвaтa зa cъбиpaнe културa oт инкубaтoрa и внимaтeлнo рaзкaтeтe флaкoнa, зa дa рecyceндирaтe кeткитe.
- Пpeхвърлeтe cъдържaниeтo нa вceки cлaйд-флaкoн в цeнтpoфyжнa eпpyeткa oт 15 ml.
- Дoбaвeтe 40 µl изхoдeн рaзтвoр нa кoлцeмид (10 µg/ml) към вcякa eпpyeткa c културa. Зaтвoрeтe плътнo eпpyeткитe c кaпaчкa и внимaтeлнo смeceтe c пpeoбpъщaнe.
- Инкубиpáйтe eпpyeткитe при 35° C – 39° C зa 45 минyти.
- Слeд инкубaция цeнтpoфyгирáйтe eпpyeткитe зa 8 минyти при 1000 rpm.
- Внимaтeлнo аспирaрaйтe cупepнaтaнтa oт вcякa eпpyeткa c вáкyуm аспирaтop c филтър зa рaзвoритeл. Внимaвáйтe дa нe аспирaтe пeлeтaтa.
- Рecyceндирaйтe пeлeтaтa oт кeткити, кaтo пoтyпaтe c пpъcт дънoтo или cтeнaтa нa вcякa eпpyeткa.
- Нaстрoйтe тaймepa нa 20 минyти.
- Дoбaвeтe нa кaпки 3 – 4 ml oт пpeдвapитeлнo зaтoплeн (35° C – 37° C) хипoтoничeн рaзтвoр (0,075 M кaлиeв хлopид).
- Зaтвoрeтe плътнo eпpyeткaтa c кaпaчкa и внимaтeлнo смeceтe, кaтo пoтyпaтe c пpъcт дънoтo или cтeнaтa нa eпpyeткaтa.
- Дoбaвeтe нa кaпки 5 – 6 ml oт пpeдвapитeлнo зaтoплeн (35° C – 37° C) хипoтoничeн рaзтвoр. Зaтвoрeтe плътнo eпpyeткaтa c кaпaчкa и я oбърнeтe.
- Пoвтoрeтe cтъпки 9 – 11 зa вcякa eпpyeткa.

- Оcтaвeтe eпpyeткитe дa пpecтoят нa воднa бaния при 35° C – 37° C. Oбърнeтe ги вeднъж, кoгaтo 20-минyтния тaймep cтигнe дo пoлoвинaтa.

HRVATSKI

INDIKACIJE ZA UPOTREBU

Medij CHANG Marrow namijenjen je za uzgoj primarne kulture kliničkih kultura ljudske koštane srži u svrhu kariotipizacije i drugih genetičkih testiranja za različite hematološke poremećaje.

OPIS PROIZVODA

Medij CHANG Marrow spreman je za upotrebu, a sastoji se od IMDM-a s FBS-om, pufera HEPES, L-glutamina, kondicioniranog medija gigantocelularnog tumora (GCT), rekombinantnog humanog GM-CSF-a i gentamicinsulfata. Medij CHANG Marrow optimiran je kako bi podržao učinkovit rast stanica koštane srži za citogenetičku analizu. Nije potrebno dodavati nikakve komponente prije uzgoja kulture koštane srži. Medij CHANG Marrow sadrži gentamicinsulfat (50 mg/l). Po želji se mogu dodati dodatni antibiotici.

KOMPONENTE

Aminokiseline	Proteini, hormoni i čimbenici rasta	Antibiotik
Alanin	Natrijev klorid	Gentamicinsulfat
Arginin	Fetalni goveđi serum (FBS)	
Asparagin	hrGM-CSF	Ostalo
Aspartatna kiselina		Biotin
Cistin		Kondicionirani medij gigantocelularnog tumora (GCT-CM)
Glutamatna kiselina	Soli i ioni	
Glutamin	Natrijev klorid	
Glicin	Natrijev selenit	
Histidin	Kalijev klorid	Vitamini i elementi u tragovima
Izoleucin	Kolinijev klorid	Folna kiselina
Leucin	Kalijev klorid	Nikotinamid
Lizin	Kalijev nitrat	Riboflavin
Metionin	Magnezijev sulfat	Tijamin
Fenilalanin	Natrijev fosfat	Pantotenska kiselina
Prolin		Kobalamin
Serin	Pufteri	Pinidoksin
Treonin	Natrijev	
Triptofan	hidrogenkarbonat	
Tirozin	HEPES	Voda
Valin		Kvaliteta u skladu vodu za injekcije
	Energetski supstrati	
	Glukoza	
	Piruvat	
	Inozitol	

OSIGURANJE KVALITETE

Više čimbenika – uključujući izvor uzoraka, uvjete uzgoja kulture i odabir reagensa – može utjecati na konačan rezultat. Korisnicima se preporučuje da ispitaju svaku novu proizvodnu seriju reagensa upotrebljavajući je paralelno s referentnim materijalom za koji je već utvrđeno da djeluje na odgovarajući način prije nego tu novu seriju počnu rutinski upotrebljavati. Performanse svake proizvodne serije medija CHANG Marrow ispitane su na kliničkim kulturama koštane srži u neovisnom laboratoriju za kliničku citogenetiku i uspoređene su s kontrolnim medijem. Rezultati su navedeni na Potvrdi o analizi svake proizvodne serije.

POTREBNI MATERIJALI I OPREMA KOJI NISU PRILOŽENI

- Plastične sterilne epruvete za centrifugu i tikvice za kulturu
- CO₂ inkubator pri 37 °C
- Stolna centrifuga
- Vrtožna miješalica
- Temeljna standardna otopina kolcemida 10 µg/ml
- Otopina kalijevog klorida 0,075 mol/l
- Otopina za fiksaciju, metanol:octena kiselina (3:1)

PRIPREMA ZA UPOTREBU

Odmrznite preko noći u hladnjaku (2 – 8 °C), zatim nežno promiješajte da osigurate homogenost. Aseptički prenijeti 10 ml medija u sterilne tikvice za kulturu i uravnotežiti na 37 °C kako bi se mogao odmah upotrijebiti.

UPUTE ZA UPOTREBU

I. Priprema uzorka:

Upotrijebiti 0,5 do 1,0 ml aspirata koštane srži u heparinnatriju. Litijev heparin, EDTA i citratni anti-koagulasi nisu pogodni za citogenetička ispitivanja.

- Dobije li se više od 5 ml aspirata koštane srži, moguće je da je uzorak hemodiluiran. Centrifugirati uzorak 8 minuta na 1.200 o/min kako bi se izolirala frakcija koštane srži.
- Zaprimi li se uzorak u mediju za prijenos, centrifugirati uzorak 8 minuta na 1.200 o/min i ukloniti medij za prijenos (supernatant). Inokulirati preostalom centrifugiranom frakcijom s dna epruvete.

Dodatne pojedinosti o upotrebi ovih proizvoda svaki laboratorij treba potražiti u svojim laboratorijskim postupcima i protokolima koji su posebno razvijeni i optimirani za medicinski program upravo tog laboratorija.

II. Kultura koštane srži:

na svim posudama s kulturama navesti ime pacijenta, broj uzorka i vrstu kulture.

- Prije inokulacije uzorka, dovedite CHANG Marrow na sobnu temperaturu.
- Inokulirati svaku kulturu odgovarajućom količinom uzorka kako bi se postigla optimalna koncentracija od 1x10⁶ stanica/ml ili 10x10⁶ stanica po 10 ml kulture.
- Svaki laboratorij mora utvrditi broj kultura koje mora pripremiti ovisno o kliničkim indikacijama pacijenta. Po želji se mogu dodati dodatni čimbenici rasta.
- Inkubirati kulture pri 35 – 39 °C, u atmosferi od 5 – 8% CO₂ dok ne budu spremne za prikupljanje.

Prikupljanje kultura:

- Ukloniti kulturu spremnu za prikupljanje iz inkubatora i lagano zavrtiti tikvicu da bi se obnovila suspenzija stanica.
- Prenijeti sadržaj svake tikvice u epruvetu od 15 ml za centrifugu.
- U svaku epruvetu kulture dodati 40 µl temeljne standardne otopine kolcemida (10 µg/ml). Čvrsto začepiti epruvete i miješati prevrtanjem.
- Inkubirati epruvete 45 minuta pri 35 – 39 °C.
- Nakon inkubacije centrifugirati epruvete 8 minuta na 1.000 o/min.
- Pažljivo aspirirati supernatant iz svake epruvete s pomoću vakuumskog aspiratora proizvodvom za ekstrakciju otopala. Pripazite da ne aspirirate talog.
- Obnoviti suspenziju taloga stanica tapkanjem prstom po dnu ili sa strana svake epruvete.
- Pokrenite 20-minutni brojač vremena.

- Dodati kap po kap 3 – 4 ml prethodno zagrijane (35 – 37 °C) hipotonične otopine (0,075 M kalijev klorid).
- Čvrsto začepiti epruvetu i lagano promiješati tapkanjem prstom po dnu ili sa strana epruvete.
- Dodati kap po kap 5 – 6 ml prethodno zagrijane (35 – 37 °C) hipotonične otopine. Čvrsto začepiti i prevnuti epruvetu.
- Ponoviti 9. – 11. korak za svaku epruvetu.
- Pustiti da epruvete odoje u vodenog kupelji na 35 – 37 °C. Prevnuti epruvete jedanput na polovici vremena 20-minutnog brojača.
- Po isteku vremena 20-minutnog brojača, ukloniti epruvete iz vodene kupelji i dodati 1 ml svježeg 3:1 Carnoyevog fiksativa u svaku epruvetu. Čvrsto začepiti i prevnuti svaku epruvetu. (ovo je korak prije fiksativa)

- Centrifugirati epruvete 8 minuta na 1.000 o/min.

- Aspirirati supernatant iz svake epruvete, ostavljajući oko 1 ml iznad taloga stanica. Pripazite da ne aspirirate talog, paziti na vlaknasti materijal koji se može protezati iz taloga stanica u supernatant nakon centrifuge. Možda će biti potrebno ručno ukloniti posljednjih nekoliko ml supernatanta koristeći se Pasteurovom pipetom (ne vakuumskom aspiracijom) da ne bi došlo do aspiracije čitavog taloga stanica u spremnik za otpad.

- Obnoviti suspenziju taloga stanica kako je opisano u 7. koraku.

- Dodati kap po kap 3 – 4 ml svježeg 3:1 Carnoyevog fiksativa.

- Dodati preostali fiksativ do 7 ml.

- Ponoviti 16. – 19. korak za svaku epruvetu.

- Neka odojsti 10 minuta pri sobnoj temperaturi. (ovo je prvi korak fiksativa)

- Centrifugirati epruvete 8 minuta na 1.000 o/min.

- Aspirirati supernatant i ostaviti otprilike 1 ml iznad taloga. Obnoviti suspenziju taloga stanica.

- Dodati fiksativ do 7 ml. Centrifugirati epruvete 8 minuta na 1.000 o/min. (drugi korak fiksativa)

- Ponoviti 22. – 23. korak (treći korak fiksativa).

- Sada se fiksirane taloge stanica može odmah upotrijebiti za pripremu stakalaca u skladu sa standardnim protokolom laboratorija ili ih se može pohraniti u hladnjaku (2 – 8 °C) ili zamrzivaču za upotrebu u budućnosti.

POHRANA I STABILNOST

Medij CHANG Marrow mora se čuvati zamrznut na temperaturi manjoj od -10 °C dok ne bude spreman za upotrebu. Medij CHANG Marrow stabilan je do isteka roka valjanosti koji je naveden na oznaci boce kada ga se čuva u zamrznutom stanju. Nakon odmrzavanja sav neiskorišten proizvod može se raspodijeliti u alikvote odgovarajuće veličine za rad i ponovno zamrznuti za kasniju upotrebu ili ga se može čvrsto začepiti i čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C najviše 30 dana. Zaštiti od fluorescentnog svjetla.

MJERE OPREZA I UPOZORENJA

Predviđeno je da se ovim proizvodom koristi osoblje osposobljeno za postupke koji uključuju primjenu za koju je namijenjen ovaj proizvod.

Medij CHANG Marrow sadrži FBS i kondicionirani medij GCT-a i njime se mora rukovati primjenjujući univerzalne laboratorijske mjere opreza. Medij sadrži antibiotik (gentamicinsulfat) kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije bakterijama, no u radu s medijem moraju se uvijek primjenjivati aseptičke metode. Ne upotrebljavati medij koji nije crvene boje.

MALTI

INDIKAZZJONI GHALL-UŻU

CHANG Marrow huwa mahsub għall-użu fil-kultura primarja ta' Kulturi kliniċi ta' Mudullun Uman għall-karjotippar u testijiet ġenetiċi oħra ta' diversi mard ematologiku.

DESKRIZZJONI TAL-APPARAT

CHANG Marrow huwa midjum lest għall-użu li fih IMDM, b'FBS, bafer ta' HEPEs, L-glutamine, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium, Recombinant Human GM-CSF u Gentamicin Sulfate. CHANG Marrow ġie ottimizzat sabiex jappoġġa t-tkabbir effiċjenti taċ-ċelloli tal-mudullun għall-analiżi ċitogenetika. Mhix meħtieġa ż-żieda ta' ebda komponenti qabel it-tkabbir tal-mudullun. CHANG Marrow fih gentamicin (50 mg/L). Jistgħu jiżdiedu antibjotiċi addizzjonali jekk ikun mixtieġ.

KOMPONENTI

<i>Aċidi Amminċi</i>	<i>Proteini, Ormoni u Fatturi ta' Tkabbir</i>	<i>Antibjotiku</i>
Alanine	Fetal bovine serum (FBS)	Gentamicin Sulfate
Arginine	hrGM-CSF	
Asparagine		Oħrajn
Aspartic Acid		Biotin
Cystine		Giant cell tumor conditioned midjum (GCT-CM)
Glutamic Acid	<i>Imluha u Joni</i>	
Glutamine	Sodium chloride	
Glycine	Sodium selenite	
Histidine	Calcium chloride	<i>Vitamini</i>
Isoleucine	Choline chloride	<i>u mikroelementi</i>
Leucine	Potassium chloride	Folic acid
Lysine	Potassium nitrate	Nicotinamide
Methionine	Magnesium sulfate	Riboflavin
Phenylalanine	Sodium phosphate	Thiamine
Proline		Pantothenic acid
Serine	<i>Baferi</i>	Cobalamin
Threonine	Sodium bicarbonate	Pyridoxine
Tryptophan	HEPES	
Tyrosine		<i>Ilma</i>
Valine	<i>Substrati tal-Enerġia</i>	Kwalità tal-WFI (Ilma għall-Injezzjonijiet)
	Glucose	
	Pyruvate	
	Inositol	

ASSIGURAZZJONI TAL-KWALITÀ

Bosta fatturi inkluż i-sors tal-kampjuni, il-kundizzjonijiet tat-tkabbir u l-għażla tar-reagenti jistgħu jinfluenzaw ir-riżultat miksub. L-utenti jingħataw il-parir li jħaddmu kull ammont ġdid tar-reagent b'mod parallel mal-materjal ta' referenza b'attività xierqa magħrufa qabel ma jibda jintuża b'mod regolari. Il-prestazzjoni ta' kull lott ta' CHANG Marrow ġiet ittestjata fuq Kulturi Kliniċi tal-Mudullun f'Laboratorju ta' Ċitogenetika Klinika indipendenti fi tqabbil ma' midjum ta' kontroll. Ir-riżultati jiġu rrapportati fuq Certifikat ta' Analizi speċifiku.

MATERJALI U TAGHMIR MEHTIEĠ IŻDA MHUX IPPOVDUT

- Tubi Sterili tal-Plastik taċ-Ċentrifugu u Flasks tat-Tkabbir
- Inkubatur ta' CO₂ f'temperatura ta' 37°C
- Centrifugu ta' fuq il-Bank
- Vortex Mixer
- Soluzzjoni Ewlenija ta' Colcemid, 10 µg/mL
- Soluzzjoni ta' Potassium Chloride, 0.075 M
- Soluzzjoni Fissativa, Methanol:Acetic Acid (3:1)

PREPARAZZJONI GHALL-UŻU

Halli li jinhall matul il-lejl fi friġġ (2 - 8 °C), imbagħad hallat bil-mod sabiex tiġi żgurata l-omoġeneità. B'mod asettiku distribwixxi 10 mL tal-midjum go flasks sterili tat-tkabbir u ekwilibra għal temperatura ta' 37°C għall-użu immedjat.

ISTRUZZJONIJIET DWAR L-UŻU

I. Preparazzjoni tal-Kampjun:

Uża 0.5 sa 1.0 mL ta' aspirat tal-mudullun miżjud b'sodium heparin. Lithium heparin, EDTA, jew citrate anticoagulants mhumiex adattati għal studji ċitogenetiċi.

- Jekk iktar minn 5 mL ta' aspirat tal-mudullun jiġi riċevut, il-kampjun jista' jiġi emodilwit (hemodilute). Iċċentrifuga l-kampjun 'l isfel fuq 1,200 rpm għal 8 minuti sabiex tiżola l-parti tal-mudullun.
- Jekk il-kampjun jaasal f'midjum tat-trasport, iċċentrifuga l-kampjun 'l isfel fuq 1,200 rpm għal 8 minuti u neħhi l-midjum tat-trasport (is-supernatant). Inokula bl-użu tal-frazzjoni ċċentrifugata li jifdal fil-qiegħ tat-tubu.

Għal dettalji addizzjonali dwar l-użu ta' dawn il-prodotti, kull laboratorju għandu jikkonsulta l-proċeduri u l-protokoll tal-laboratorju tiegħu stess li ġew żviluppati u ottimizzati speċifikament għall-programm mediku individwali tiegħek.

II. It-Tkabbir tal-Mudullun:

A-tgħid tikketta bl-isem tal-pazjent, in-numru tal-kampjun, u t-tip ta' kultura fuq il-kontenituri tal-kulturi kollha.

- Qabel l-inokulazzjoni tal-kampjun, ġib iċ-CHANG Marrow għal temperatura ambjentali.
- Inokula kull kultura bl-ammont xieraq tal-kampjun sabiex tilhaq il-konċentrazzjoni ottimali ta' 1x10⁶ ċelloli/mL jew 10 x 10⁶ ċelloli għal kull 10 mL tal-kultura.
- Kull laboratorju individwali għandu jiddetermina n-numru ta' kulturi li għandu jipprepara skont l-indikazzjoni klinika tal-pazjent. Jistgħu jiżdiedu fatturi tat-tkabbir addizzjonali jekk ikun mixtieġ.
- Inkuba l-kulturi f'temperatura ta' 35 - 39°C, f'atmosfera ta' 5–8% CO₂ sakemm ikunu lesti għall-hsad.

II-Hsad tal-Kulturi:

- Neħhi l-kultura lesta għall-hsad mill-inkubatur u dawwar il-flask bil-mod biex tissospendi ċ-ċelloli mill-gdid.
- Ilttrasferixxi l-kontenut ta' kull flask għal tubu ċentrifugu ta' 15 mL.
- Żid 40 µL tas-soluzzjoni ewlenija ta' Colcemid (10 µg/mL) f'kull tubu tal-kultura. Aghlaq it-tubi b'mod sikur u hawwad billi taqbligħom 'l isfel bil-mod.
- Inkuba t-tubi f'temperatura ta' 35 - 39°C għal 45 minuta.
- Wara l-inkubazzjoni, iċċentrifuga t-tubi għal 8 minuti fuq 1,000 rpm.
- Bir-reqqa aspira s-supernatant minn kull tubu bl-użu ta' aspirazzjoni b'vakum, bl-iqugh għas-solvent. Ogħhod attent li ma taspirax il-gerbuba.

- Erga' ssospendi l-gerbuba taċ-ċelloli billi tagħti daqqa hafifa b'subgħajk lill-qiegħ jew il-ġenb ta' kull tubu.
- Issettja l-kronometru fuq 20 minuta.
- Qatra qatra, žid 3 - 4 mL ta' soluzzjoni ipotonika (0.075M Potassium Chloride) imsaħhna minn qabel (35 - 37°C).
- Aghlaq it-tubu b'mod sikur u hawwad bil-mod billi tagħti daqqa hafifa b'subgħajk lill-qiegħ jew il-ġenb tat-tubu.
- Irrepeti l-Punti 9 - 11 għal kull tubu.
- Bl-użu ta' banju bl-ilma, halli t-tubi joqogħdu f'temperatura ta' 35-37°C. Aqleb it-tubi 'l isfel darba meta l-kronometru jaasal f'nofs l-20 minuta.

- Fl-aħħar tal-20 minuta fuq il-kronometru, neħhi t-tubi mill-banjamarija u žid 1 mL ta' 3: 1 Carnoy's Fixative frisk f'kull tubu. Aghlaq it-tubu b'mod sikur u aqleb kull tubu 'l isfel. (Dan huwa l-pass ta' Qabel il-Fissattiv).
- Iċċentrifuga t-tubi għal 8 minuti fuq 1,000 rpm.

- Aspira s-supernatant minn kull tubu waqt li tħalli madwar 1 mL fuq kull gerbuba ta' ċellofi. Ogħhod attent li ma taspirax il-gerbuba. Ogħhod attent għall-materjal fibruż li jista' jestendi mill-gerbuba taċ-ċelloli 'l fuq għal gos-supernatant wara ċ-ċentrifugazzjoni. Jista' jkun li l-aħhar fit 1 mL tas-supernatant ikollhom jitnehhew manwalment b'pipetta Pasteur (mhux bl-użu ta' aspirazzjoni b'vakum) sabiex jiġi evitat li tiġi aspirata l-gerbuba taċ-ċelloli kollha fil-kontenitur tal-iskart.
- Erga' ssospendi l-gerbuba taċ-ċelloli kif deskritt fil-Punt 7.

- Qatra qatra, žid 3 - 4 mL ta' 3:1 Carnoy's Fixative frisk.
- Žid il-fissattiv li jibqa' sabiex il-volum totali fit-tubu jkun ta' 7 mL.

- Irrepeti l-punti 16 - 19 għal kull tubu.

- Hallihom joqogħdu għal 10 minuti f'temperatura ambjentali. (Dan huwa l-Ewwel pass fissattiv).

- Iċċentrifuga t-tubi għal 8 minuti fuq 1,000 rpm.

- Aspira s-supernatant u halli madwar 1 mL fuq il-gerbuba. Erga' ssospendi l-gerbuba taċ-ċelloli.

- Žid il-fissattiv, sa 7 mL. Iċċentrifuga t-tubi għal 8 minuti fuq 1,000 rpm. (It-tieni pass fissattiv).

- Irrepeti l-punti 22 - 23. (It-tielet pass fissattiv).
- F'dan il-punt, il-gerbubi taċ-ċelloli fissati jistgħu jintużaw immedjatament għall-preparazzjoni tal-islaġs skont il-protokoll standard tal-laboratorju jew jinħażnu fil-friġġ (2 - 8 °C) jew fil-frیża għall-użu fil-futur.

HAŻNA U STABBILTÀ

CHANG Marrow għandu jinħażen iffriżat f'temperatura ta' inqas minn –10°C sakemm ikun lest biex jintuża. CHANG Marrow huwa stabbli sad-data ta' skadenza li tidher fuq it-tikketta tal-filixkun meta mahżun iffriżat. Wara li jinhall, jekk jibqa' xi ammont ta' prodott li ma ntużax dan jista' jiġi ddispensat f'alikwoti uttilizzabli u iffriżat mill-gdid għal użu fil-futur, jew jingħalqa sew u jinħażen f'temperatura ta' 2 - 8 °C għal mhux iktar minn 30 jum. Ipproteġi minn daw l-fluorexxenti.

PREKAWZJONIJIET U TWISSIJET

Dan l-apparat huwa mahsub għall-użu minn persunal imħarġed fi proċeduri li jinkludu l-applikazzjoni indikata li għaliha huwa mahsub l-apparat.

CHANG Marrow fih FBS u GCT conditioned midjum u għandu jiġi mmanigġjat bil-prekawzjonijiet universali tal-laboratorju. Dan il-midjum fih antibjotiku (gentamicin sulfate) sabiex jinaqqas il-potenzjal għall-kontaminazzjoni mill-batterji, iżda dejjem għandhom jintużaw tekniki asettiki meta jiġi ddispensat dan il-midjum. M'għandek tuża l-ebda midjum li mhux ta' kulur hamrani.

INDIKACIJE ZA UPORABO

Medij CHANG Marrow je namenjen za uporabo v primarnih kliničnih kulturah humanega kostnega mozga za določanje kariotipa in druge genske preiskave različnih hematoloških motenj.

OPIS PRIPOMOČKA

CHANG Marrow je medij, ki je že pripravljen za uporabo in vsebuje IMDM, FBS, pufer HEPEs, L-glutamin, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium, Recombinant Human GM-CSF in gentamicinijev sulfat. Medij CHANG Marrow je optimiziran za podporo učinkovite rasti celic kostnega mozga za citogenetsko analizo. Pred gojenjem kostnega mozga ni treba dodati nobenih komponent. Medij CHANG Marrow vsebuje gentamicinijev sulfat (50 mg/l). Po želji lahko dodate še več antibiotikov.

KOMPONENTE

<u>Aminokisline</u>	<u>Beljakovine</u>	<u>Antibiotik</u>
Alanin	<u>hormoni in rastni faktorji</u>	Gentamicinijev sulfat
Arginin		
Asparagin	Serum govejega	<u>Drugo</u>
Asparaginska kislina	rodka (FBS)	Biotin
Cistin	irGM-CSF	Kondicioniran medij
Glutaminska kislina		iz velikoceličnih tumorjev (GCT-CM)
Glutamin	<u>Soli in ioni</u>	
Glicin	Natrijev klorid	<u>Vitaminski elementi</u>
Histidin	Natrijev selenit	<u>v sledovih</u>
Izolevcin	Kalcijev klorid	Folna kislina
Levcin	Holniklorid	Nikotinamid
Lizin	Kalijev klorid	Riboflavin
Metionin	Natrijev nitrat	Tiamin
Fenilalanin	Magnezijev sulfat	Pantotenska kislina
Prolin	Natrijev fosfat	Kobalamin
Serin		Piridoksin
Treonin	<u>Pufri</u>	
Triptofan	Natrijev bikarbonat	
Tirozin	HEPEs	<u>Voda</u>
Valin		Kakovost, ki ustreza vodi za injekcije
	<u>Energijski substrati</u>	
	Glukoza	
	Privat	
	Inozitol	

ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI

Na dobjeni rezultat lahko vpliva več dejavnikov, vključno z virom vzorcev, pogoji gojenja in izbiro reagentov. Uporabnikom svetujemo, da vsako novo serijo reagenta pred začetkom rutinske uporabe preskusijo v primerjavi z referenčnim materialom, za katerega je znana ustrezna aktivnost. Delovanje vsake serije medija CHANG Marrow je testirano na kliničnih kulturah kostnega mozga v neodvisnem laboratoriju za klinično citogenetiko v primerjavi s kontrolnim medijem. Rezultati so navedeni na analizelem certifikatu za vsako serijo.

POTREBNI MATERIALI IN PRIPOMOČKI, KI NISO PRILOŽENI

1. Plastične, sterilne, centrifugirne epruvete in bučke za gojenje kultur
2. Inkubator CO₂ pri 37 °C
3. Namizna centrifuga
4. Vrtinčni mešalnik
5. Osnovna raztopina kolcemida, 10 µg/ml
6. Raztopina kalijevega klorida, 0,075 M
7. Fiksacijska raztopina metanola in ocetne kisline (razmerje 3 : 1)

PRIPRAVA ZA UPORABO

Čez noč ga oddajte v hladilnik (2–8 °C) in nato previdno premešajte, da zagotovite homogenost. Aseptično razdelite 10 ml medija v sterilne bučke za gojenje kultur in ga uravnatežite na 37 °C za takojšnjo uporabo.

NAVODILA ZA UPORABO

I. Priprava vzorcev:

Uporabite od 0,5 do 1,0 ml aspirata kostnega mozga z dodatkom natrijevega heparina. Litijev heparin, EDTA ali citratni antikoagulansi niso primerni za citogenetsko študijo.

- Če prejmete več kot 5 ml aspirata kostnega mozga, je vzrok lahko v hemodiluciji vzorca. V tem primeru vzorec 8 minut centrifugirajte pri 1.200 vrt./min, da izolirate frakcijo kostnega mozga.
- Če vzorec prejmete v mediju za prenos, ga 8 minut centrifugirajte pri 1.200 vrt./min in odstranite medij za prenos (supernatant). Inokulirajte z uporabo preostale centrifugirane frakcije na dnu epruvete.

Dodatne podrobnosti o uporabi teh izdelkov določajo notranji laboratorijski postopki in protokoli vsakega laboratorija, ki so bili posebej razviti in optimizirani za zadevni medicinski program.

II. Gojitev kostnega mozga:

Na vse posode za gojenje kultur zapišite ime bolnika, številko vzorca in tip kulture.

1. Pred inokulacijo vzorca ogrejte medij CHANG Marrow na okoliško temperaturo.
2. Vsako kulturo inokulirajte z ustrezno količino vzorca, da dobite optimalno koncentracijo 1 x 10⁶ celic/ml ali 10 x 10⁶ celic na 10 ml kulture.
3. Število kultur, ki jih je treba pripraviti glede na bolnikovo klinično indikacijo. Po želji lahko dodate rastne faktorje.
4. Kulture inkubirajte pri 35–39 °C v atmosferi s 5–8 % CO₂, dokler ne bodo zrele za spravljanje.

Pobiranje kultur:

1. Kulturo, ki je pripravljena za spravljanje, odstranite iz inkubatorja in jo nežno vrtinčite, da ponovno suspendirate celice.
2. Vsebinsko vsake bučke prenesite v 15 ml centrifugirno epruveto.
3. V vsako epruveto s kulturo dodajte 40 µl osnovne raztopine kolcemida (10 µg/ml). Epruvete zaprite tesno in premešajte vsebinsko z obračanjem.
4. Epruvete 45 minut inkubirajte pri temperaturi 35–39 °C.
5. Po inkubaciji epruvete 8 minut centrifugirajte pri 1.000 vrt./min.
6. Supernatant iz vsake epruvete previdno aspirirajte z vakuumskim aspiratorjem, ki ima lovilnik topli. Pazite, da ne boste aspirirali usedline.
7. Celično usedlino ponovno suspendirajte, tako da po dnu ali strani vsake epruvete potrkate s prstom.
8. Sprožite 20-minutni časovnik.
9. Po kapljicah dodajte 3–4 ml predhodno ogrete (35–37 °C) hipotonične raztopine (0,075 M kalijev klorid).
10. Epruveto tesno zaprite in nežno zmešajte, tako da po dnu ali strani epruvete potrkate s prstom.
11. Po kapljicah dodajte 5–6 ml predhodno ogrete (35–37 °C) hipotonične raztopine. Epruveto tesno zaprite in obrnite na glavo.
12. Za vsako epruveto ponovite korake od 9–11.
13. Z vodno kopeljo pustite epruvete stati pri 35–37 °C. Epruvete obrnite enkrat na sredini 20 minut časovnika.
14. Ko 20 minut na časovniku poteče, epruvete odstranite iz vodne kopeli in vsaki epruveti dodajte 1 ml svežega fiksacijskega sredstva Carnoy's Fixative v razmerju 3 : 1. Vsako epruveto dobro zatesnite s pokrovčkom in jo obrnite na glavo. (To je korak pred fiksacijo.)

15. Epruvete centrifugirajte 8 minut pri 1.000 vrt./min.
16. Supernatant iz vsake epruvete aspirirajte, pri tem pa pustite približno 1 ml nad celično usedlino. Pazite, da ne boste aspirirali usedline. Pazite na vlaknasto snov, ki se po centrifugiranju lahko širi iz celične usedline v supernatant. Zasnijte nekaj ml supernatanta boste morda morali ročno odstraniti s Pasteurjevo pipeto (ne z vakuumsko aspiracijo), da preprečite aspiracijo celotne celične usedline v posodo za odpadke.
17. Ponovno suspendirajte celično usedlino, kot je opisano v 7. koraku.
18. Po kapljicah dodajte 3–4 ml svežega fiksacijskega sredstva Carnoy's Fixative v razmerju 3 : 1.
19. Preostalo fiksacijsko sredstvo dodajte do prostornine 7 ml.
20. Za vsako epruveto ponovite korake od 16–19.
21. Epruvete pustite stati 10 minut pri sobni temperaturi. (To je prvi korak fiksacije.)
22. Epruvete centrifugirajte 8 minut pri 1.000 vrt./min.
23. Aspirirajte supernatant, tako da nad celično usedlino ostane približno 1 ml. Celično usedlino suspendirajte še enkrat.
24. Fiksacijsko sredstvo dodajte do prostornine 7 ml. Epruvete centrifugirajte 8 minut pri 1.000 vrt./min. (Drugi korak fiksacije.)
25. Ponovite korake od 22 do 23. (Tretji korak fiksacije.)
26. Na tej točki se lahko fiksirane celične usedline takoj uporabijo za pripravo preparatov skladno s standardnim protokolom laboratorija ali shranijo v hladilnik (2–8 °C) ali zamrzovalnik za nadaljnjo uporabo.

SHRANJEVANJE IN STABILNOST

Medij CHANG Marrow je treba shranjevati zamrznjen pri temperaturi pod –10 °C, dokler ni pripravljen za uporabo. Če se medij CHANG Marrow shranjuje zamrznjen, je stabilen do datuma izteka uporabnosti, ki je naveden na nalepki steklenice. Oddaljen izdelek, ki ga niste porabili, lahko razdelite na delovne alikvote in ponovno zamrznete za poznejšo uporabo ali pa dobro zaprete s pokrovčkom in do 30 dni hranite pri temperaturi 2–8 °C. Zaščitite pred fluorescenčno svetlobo.

PREVIDNOSTNI UKREPI IN OPOZORILA

Ta pripomoček sme uporabljati samo osebe, usposobljene za postopke, ki vključujejo indicirano uporabo, za katero je pripomoček zasnovan.

CHANG Marrow vsebuje kondicioniran medij (FBS in GCT) in z njim je treba ravnati skladno z univerzalnimi laboratorijskimi previdnostnimi ukrepi. Medij vsebuje antibiotik (gentamicinijev sulfat) za zmanjšanje tveganja bakterijske kontaminacije, vendar je treba pri razporejanju medija vedno uporabljati aseptične tehnike. Ne uporabljajte nobenega medija, ki ni rdeče barve.