IrvineScientific

CHANG Medium MF
Mitogen-Free

Catalog No. 91005 **100 mL, 500 mL**

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 -diagnostiikkaan.

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.

İn vitro diagnostik kullanım için.

Na diagnostické použitie *in vitro*.

За *in vitro* диагностична употреба.

Za upotrebu u *in vitro* dijagnostici.

Għal użu dijanjostiku *in vitro*.

Za diagnostično uporabo *in vitro*.

Glossary of Symbols*:

REF	Catalog Number
LOT	Lot Number
STERILE A	Sterilized using aseptic processing techniques (filtration)
	Expiration: Year - Month - Day
	Caution, consult accompanying documents
	Consult instructions for use
-10°C	Storage Temperature below -10°C
2 STERILIZE	Do not resterilize
	Do not use if package is damaged
	Manufacturer
CE	CE Mark
EC REP	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.

Irvine Scientific, LLC
1830 E. Warner Ave., Santa Ana, California 92705 USA
Telephone: 1 949 261 7800 • 1 800 437 5706 • Fax: 1 949 261 6522 • www.irvinesci.com

PN 40747 Rev.09
Effective Date: 24-FEB-2025

REFERENCES

1. Arakaki, D.T. and Sparkes, R.S. (1963), *Cytogenetics,* 2, 57-60.
2. Li, J.G. et Osgood, E.E. (1949). Blood, 4, 670
3. Maluish, A.E. and Strong, D. M. (1986). In Manual of Clinical Laboratory Immunology, pp. 274-281, 3rd Edition, Eds. N.R. Rose, H. Friedman and J.L. Fahey. *American Society for Microbiology,* Washington, D.C.
4. Nowell, P. C. (1960). *Cancer Research 20,* 462-466.
5. Waithe, W. I. And Hirschron, K. (1978). In Handbook of Experimental Immunology, 3rd Edition, D. M. Weir, Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Chapter 26- Lymphocyte responses to activators.
6. Watt, J.L. and Stephen G.S. (1986). In Human Cytogenetics: a practical approach, pp. 39-55. Eds.D. E. Rooney and B.H. Czepulkowski, IRL Press Ltd., Oxford.
7. A proposed Standard System of Nomenclature of Human Mitotic Chromosomes. (1960) *Lancet, I,* 1063.

ENGLISH

INDICATION FOR USE

CHANG Medium MF is a mitogen-free, ready to use medium for use in culturing peripheral blood and other specimens for purposes of cytogenetic analysis.

DEVICE DESCRIPTION

CHANG Medium MF consists of RPMI containing 20% FBS, 2 mM glutamine, 20 mM HEPES buffer and the antibiotic Gentamicin Sulfate. It may require the addition of mitogenic agents, such as phytohemagglutinin (PHA) to optimize the growth of peripheral blood and other cells. The required concentration of PHA (or other mitogens) should be determined by the individual laboratory.

COMPONENTS

Amino Acid
Arginine
Asparagine
Aspartic Acid
Cystine
Glutamic Acid
Glutamine
Glycine
Histidine
Isoleucine
Leucine
Lysine
Methionine
Phenylalanine
Proline
Serine
Threonine
Tryptophan
Tyrosine
Valine

Water
WFI Quality

Proteins, Hormones, and Growth Factors
Fetal bovine serum (FBS)

pH Indicator
Phenol red

Other
Biotin
Hydroxyproline
Glutathione

Buffers
Sodium bicarbonate
HEPES

Energy Substrates
Glucose
Inositol

Salts & Ions
Sodium chloride
Choline chloride
Calcium nitrate
Potassium chloride
Magnesium sulfate
Sodium phosphate

Antibiotic
Gentamicin Sulfate

Vitamins and trace elements
Folic acid
Nicotinamide
Riboflavin
Thiamine
Pantothenic acid
Cobalamin
Pyridoxine
Aminobenzoic acid

QUALITY ASSURANCE

STERILITY

Serum used in the production of CHANG Medium MF has been tested for viral contamination per CFR Title 9 Part 113.53. It has also been screened for mycoplasma contamination. CHANG Medium MF is sterilized by filtration through a 0.1 micron filter. Samples of CHANG Medium MF are tested for possible bacteriological contamination following the sterility testing protocol described in the current USP Sterility test <71>.

Several factors including source of sample, 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 Medium MF is evaluated using peripheral blood for mitotic index, chromosomal length and quality compared to a control medium. Results are reported on a lot specific Certificate of Analysis.

MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Phytohemagglutinin (PHA) Solution (9 mg/mL), Sterile
2. Phenol-Free Heparin
3. Colcemid 25 µg/mL Solution
4. Potassium Chloride Solution, 75 mM
5. Acetic Alcohol, 1 part Glacial Acetic Acid: 3 parts Methanol (Analytical Reagent Grade)
6. Giemsa or 2% Acetic Acid-orcein
7. Chromic acid
8. Mountant
9. Glass Slides and Coverslips
10. Plastic Centrifuge Tubes
11. CO_2 Incubator
12. Bench Centrifuge
13. Vortex Mixer
14. Light Microscope

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

The success of whole blood cultures for cytogenetic analysis is influenced by the level of lymphocytes with normal function at the time of sampling. As this level can be affected by infection and drugs, wherever possible subjects for cytogenetic studies should not have taken drugs for 7 days prior to collection of blood for tests. Similarly, the mitotic index may be greatly reduced during the anergic phases of certain diseases (e.g. Hodgkin's disease, sarcoidosis, etc.) and, to a lesser degree, in normal individuals during the later stages of pregnancy. Preservative must not be added to blood samples for lymphocyte culture. Aseptic techniques are essential.

Blood samples should be tested without delay whenever possible. If absolutely necessary, they may be stored at 2°C to 8°C for no longer than 48 hours.

PREPARATION FOR USE

Thaw overnight in a refrigerator (2–8°C) then gently mix to assure homogeneity. Aseptically dispense 10 mL of medium into sterile culture flasks and equilibrate to 37°C for immediate use.

Note: Calcium Carbonate crystals commonly form in CHANG Medium MF. The presence of these crystals has not been shown to cause any detrimental effect on product performance.

DIRECTIONS FOR USE

Whole blood or separated leukocytes have been used for cytogenetic studies, but the former is the simplest and most widely used in routine studies. As with any cell culture procedure, optimal results are dependent on establishing adequate culture conditions. Since the relative content of active PHA may vary slightly between different batches, it may be beneficial to test two concentrations of PHA.

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.

I. Sample Preparation:

Obtain 5-10 mL for adults, of fresh blood in sodium heparin,and 2-3 mL for pediatrics.

- Whole blood should be received at room temperature and mixed by inversion.
- Lymphocytes from whole blood can be stimulated with Phytohemagglutinin (PHA) and may be cultured with a synchronization technique.

II. Whole Blood Culture

Label all culture vessels with patient name, specimen number, and culture type.

1. Before inoculation of specimen bring CHANG Medium MF to ambient temperature.
2. Reconstitute PHA by adding 5 mL of sterile distilled water, using a sterile syringe.
3. Prepare required 5 mL of CHANG Medium MF necessary for each culture vessel, using aspectic technique.
4. Add 0.1 mL of reconstituted PHA per culture vessel.
5. Inoculate 0.3 mL of sample per culture. If the patient is an infant (<1mo old), inoculate with 0.2 mL of sample.
6. Each individual laboratory should determine the number of cultures to set up depending on the clinical indication and age of the patient. An additional 48 hour culture is to be initiated on specimens from newborns (<1mo old) without synchronization.
7. Incubate cultures at 35 - 39°C, 5 - 8% CO_2 atmosphere until ready for harvest.
8. For synchronization: After 48 hours of incubation add 50µL per 5ml of working solution Methotrexate to each culture to be harvested at 72 hours. Add 100µL per 5 ml, working solution Thymidine to each culture 18- 19 hours after adding Methotrexate (5 - 6 hours before harvest).

III. Harvesting the Cultures:

1. Remove 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 (10 µg/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 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, drop-wise, of pre-warmed (35 - 37°C) hypotonic solution. Tightly cap tube and invert tube.
12. Repeat Steps 8 -10 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. Add 1 mL of fresh 3:1 Carnoy's Fixative to each tube, at the end of the 20 minute timer. 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 - 18 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 23 - 24. (Third fixative step).
26. At this point, fixed cell 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.

CLINICAL APPLICATIONS

The modal human chromosome number is 46. Human chromosomes have been classified according to their length and the position of the centromere (Denver Classification). Aberrations of chromosomal constitution have been associated with a number of congenital disorders such as Down syndrome (typically with an additional small autosome) and syndromes associated with indeterminate sexuality (Turner's syndrome, Klinefelter's syndrome and others, where the sex chromosomes are found to be abnormal). An acquired chromosomal abnormality can be detected in a proportion of the leukocytes in chronic myelocytic leukemia (the "Philadelphia" chromosome) and the progress of treatment may be assessed by following this marker. As the limit of tolerance is approached in radiation therapy, there is a marked increase in the proportion of cells with bizarre chromosomal constitution and the appearance of these cells has been used as a guide to dosage.

STORAGE AND STABILITY

Store CHANG Medium MF frozen, below -10°C, until ready to use. CHANG Medium MF 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 (maximum of two times) 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 Medium MF contains FBS 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 media. Do not use any medium that is not red in color.

DEUTSCH

INDIKATIONEN

CHANG Medium MF ist ein mitogenfreies, gebrauchsfertiges Medium für die Kultivierung von peripherem Blut und anderen Proben für zytogenetische Analysen.

PRODUKTBESCHREIBUNG

CHANG Medium MF besteht aus RPMI mit 20 % FBS, 2 mM Glutamin, 20 mM HEPES-Puffer und dem Antibiotikum Gentamicinsulfat. Es erfordert ggf. die Zugabe von Mitogenen, wie Phytohämagglutinin (PHA), um das Wachstum von peripheren Blut- und anderen Zellen zu optimieren. Die erforderliche Konzentration von PHA (oder anderen Mitogenen) ist vom jeweiligen Labor zu bestimmen.

INHALTSSTOFFE

Aminosäure

Arginin
Asparagin
Asparaginsäure
Cystin
Glutaminsäure
Glutamin
Glycin
Histidin
Isoleucin
Leucin
Lysin
Methionin
Phenylalanin
Prolin
Serin
Threonin
Tryptophan
Tyrosin
Valin

Wasser

Wasser für Injektionszwecke (WFI)

Proteine, Hormone und Wachstumsfaktoren

Fetales Kälberserum (FBS)

pH-Indikator

Phenolrot

Andere

Biotin
Hydroxyprolin
Glutathion

Puffer

Natriumbicarbonat
HEPES

Energiesubstrate

Glukose
Inositol

Salze und Ionen

Natriumchlorid
Cholinchlorid
Calciumnitrat
Kaliumchlorid
Magnesiumsulfat
Natriumphosphat

Antibiotikum

Gentamicinsulfat

Vitamine und Spurenelemente

Folsäure
Nikotinamid
Riboflavin
Thiamin
Pantothensäure
Cobalamin
Pyridoxin
Aminobenzoesäure

QUALITÄTSSICHERUNG

STERILITÄT

Das bei der Produktion des CHANG Medium MF verwendete Serum wurde auf virale Kontamination gemäß CFR Titel 9, Teil 113.53, getestet. Es wurde außerdem auf Mykoplasmakontamination überprüft. Das CHANG Medium MF wurde durch Filtration durch einen 0,1-Mikron-Filter sterilisiert. Es wurden Proben des CHANG Medium MF auf mögliche bakterielle Kontamination getestet, wobei das im aktuellen USP-Sterilitätstest <71> beschriebene Sterilitätstestprotokoll befolgt wurde.

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.

Jede Charge CHANG Medium MF wird unter Verwendung von peripherem Blut im Hinblick auf Mitoseindex, Chromosomenlänge und -qualität im Vergleich zu einem Kontrollmedium bewertet. Die Ergebnisse sind auf einem chargenspezifischen Analysezertifikat angegeben.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN UND HILFSSTOFFE (NICHT IM LIEFERUMFANG)

1. Phytohämagglutinin(PHA)-Lösung (9 mg/ml), steril
2. Phenolfreies Heparin
3. Colcemid 25 µg/ml Lösung
4. Kaliumchloridlösung, 75 mM
5. Essigsäurealkohol, 1 Teil Eisessig: 3 Teilen Methanol (analytische Reagenzqualität)
6. Giemsa oder 2 % Essigsäure-Orcein
7. Chromsäure
8. Einbettungsmittel
9. Glasobjektträger und Deckgläser
10. Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff
11. CO_2-Inkubator
12. Tischzentrifuge
13. Vortexmischer
14. Lichtmikroskop

PROBENAHME UND HANDHABUNG

Der Erfolg von Vollblutkulturen für die zytogenetische Analyse wird durch den Gehalt an normal funktionierenden Lymphozyten zum Zeitpunkt der Probenahme beeinflusst. Da dieser Gehalt durch Infektionen und Medikamente beeinflusst werden kann, sollten Teilnehmer an zytogenetischen Studien nach Möglichkeit 7 Tage lang vor der Blutabnahme für Tests keine Medikamente einnehmen. Entsprechend kann der Mitoseindex in den anergischen Phasen bestimmter Krankheiten (z. B. Morbus Hodgkin, Sarkoidose usw.) stark und bei gesunden Schwangeren in späteren Stadien der Schwangerschaft in geringerem Maße reduziert sein. Blutproben für die Lymphozytenkultur dürfen keine Konservierungsmittel zugesetzt werden. Die Anwendung aseptischer Techniken ist unerlässlich.

Wann immer möglich, sollten Blutproben unverzüglich getestet werden. Wenn absolut notwendig, können sie maximal 48 Stunden bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

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.

Hinweis: Häufig bilden sich Calciumcarbonatkristalle im CHANG Medium MF. Es gibt keine Hinweise, dass die Anwesenheit dieser Kristalle die Produktleistung beeinträchtigt.

GEBRAUCHSANWEISUNG

Für zytogenetische Untersuchungen hat sich die Verwendung von Vollblut oder isolierten Leukozyten bewährt. Ersteres ist jedoch das einfachste und in Routineuntersuchungen am häufigsten verwendete Material. Wie bei jedem Zellkulturverfahren sind optimale Ergebnisse von der Schaffung angemessener Kulturbedingungen abhängig. Da der relative Gehalt an aktivem PHA zwischen verschiedenen Chargen leicht variieren kann, ist es ggf. von Vorteil, zwei PHA-Konzentrationen zu testen.

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.

I. Probenvorbereitung:

Bei Erwachsenen mit 5–10 ml und bei Kindern mit 2–3 ml frischem natriumheparinisiertem Blut arbeiten.

- Vollblut ist bei Raumtemperatur in Empfang zu nehmen und durch Umdrehen zu mischen.
- Lymphozyten aus Vollblut können mit Phytohämagglutinin (PHA) angeregt und mittels Synchronisationstechnik kultiviert werden.

II. Vollblutkultur:

Alle Kulturgefäße mit Patientennamen, Probennummer und Kulturtyp beschriften.

1. Das CHANG Medium MF vor der Beimpfung mit Probe auf Umgebungstemperatur bringen.
2. Das PHA durch Zugabe von 5 ml sterilem destilliertem Wasser mit einer sterilen Spritze rekonstituieren.
3. Unter Anwendung aseptischer Techniken die für jedes Kulturgefäß benötigten 5 ml CHANG Medium MF vorbereiten.
4. Jedem Kulturgefäß 0,1 ml rekonstitutieres PHA zusetzen.
5. Pro Kultur mit 0,3 ml Probe beimpfen. Ist der Patient ein Säugling (unter 1 Monat), mit 0,2 ml Probe beimpfen.
6. Jedes Labor ist selbst für die Bestimmung der Anzahl der vorzubereitenden Kulturen in Abhängigkeit von der klinischen Indikation und des Alters des Patienten zuständig. Für Proben von Neugeborenen (unter 1 Monat) ist eine zusätzliche 48-Stunden-Kultur ohne Synchronisation anzusetzen.
7. Kulturen bis zur Entnahme bei 35–39 °C in einer 5–8%igen CO_2-Atmosphäre inkubieren.
8. Zur Synchronisation: Nach 48 Stunden Inkubation jeder nach 72 Stunden zu entnehmenden Kultur auf 5 ml 50 µl Methotrexat-Arbeitslösung zusetzen. 18–19 Stunden nach der Zugabe von Methotrexat (5–6 Stunden vor Entnahme) jeder Kultur auf 5 ml 100 µl Thymidin-Arbeitslösung zusetzen.

III. Kulturentnahme:

1. Zur Entnahme bereite Kultur aus dem Inkubator nehmen und die Flasche zur Resuspendierung 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 Pellet 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 8–10 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. Jedem Röhrchen nach Ablauf des 20-Minuten-Zeitgebers 1 ml frisches 3:1-Carnoy-Fixiermittel zugeben. 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 16–18 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 bis zu 7 ml zugeben. Die Röhrchen 8 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugieren. (Dies ist der zweite Fixierungsschritt.)
25. Schritte 23–24 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.

KLINISCHE ANWENDUNGSBEREICHE

Die modale Zahl menschlicher Chromosomen ist 46. Die menschlichen Chromosomen wurden nach ihrer Länge und der Position des Zentromers klassifiziert (Denver-Klassifikation). Aberrationen der chromosomalen Konstitution werden mit einer Reihe von angeborenen Erkrankungen wie Down-Syndrom (typischerweise mit einem zusätzlichen kleinen Autosom) und mit Intersexualität assoziierten Syndromen (Turner-Syndrom, Klinefelter-Syndrom und andere Syndrome, bei denen die Geschlechtschromosomen als abnormal angesehen werden) in Verbindung gebracht. Eine erworbene chromosomale Abnormalität kann bei chronischer myelomonozytäre Leukämie bei einem Teil der Leukozyten („Philadelphia"-Chromosom) nachgewiesen werden, und der Fortschritt der Behandlung kann anhand dieses Markers beurteilt werden. Da sich der Toleranzgrenze bei der Strahlentherapie genähert wird, steigt der Anteil der Zellen mit bizarrer chromosomaler Konstitution deutlich an, und das Erscheinungsbild dieser Zellen wurde als Leitfaden für die Dosierung verwendet.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Das CHANG Medium MF bis zur Verwendung tiefgekühlt unter -10 °C lagern. Bei Tiefkühllagerung ist das CHANG Medium MF bis zu dem auf dem Flaschenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Nach dem Auftauen kann jedes unbenutzte Produkt in Arbeitsaliquote abgefüllt und zur späteren Verwendung wieder eingefroren (maximal zweimal) 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 Medium MF enthält FBS 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 der Medien sollten jedoch immer aseptische Techniken angewendet werden. Keine Medien verwenden, die nicht rot sind.

ITALIANO

INDICAZIONI PER L'USO

CHANG Medium MF è un terreno di coltura pronto all'uso, privo di agenti mitogeni, da usare con sangue periferico e altri campioni biologici per l'esecuzione di analisi citogenetiche.

DESCRIZIONE DEL DISPOSITIVO

CHANG Medium MF è composto dal terreno di coltura RPMI contenente 20% di siero bovino fetale, 2 mM di glutammina, 20 mM di tampone HEPES e l'antibiotico gentamicina solfato. Per ottimizzare la crescita delle cellule del sangue periferico e di altre cellule, potrebbe essere necessario aggiungere agenti mitogeni, come la fitoemagglutinina (PHA). La concentrazione richiesta di PHA (o altri mitogeni) deve essere stabilita dal laboratorio.

COMPONENTI

Aminoacidi
Arginina
Asparagina
Acido aspartico
Cistina
Acido glutammico
Glutammina
Glicina
Istidina
Isoleucina
Leucina
Lisina
Metionina
Fenilalanina
Prolina
Serina
Treonina
Triptofano
Tirosina
Valina

Acqua
Qualità WFI (acqua per iniezioni)

Proteine, ormoni e fattori di crescita
Siero bovino fetale

Indicatore di pH
Rosso fenolo

Altro
Biotina
Idrossiprolina
Glutatione

Tamponi
Bicarbonato di sodio
HEPES

Substrati energetici
Glucosio
Inositolo

Sali e ioni
Cloruro di sodio
Cloruro di colina
Nitrato di calcio
Cloruro di potassio
Solfato di magnesio
Fosfato di sodio

Antibiotico
Gentamicina solfato

Vitamine ed elementi in tracce
Acido folico
Nicotinamide
Riboflavina
Tiamina
Acido pantotenico
Cobalamina
Piridossina
Acido amminobenzoico

GARANZIA DI QUALITÀ

STERILITÀ

Il siero usato per la produzione di CHANG Medium MF è stato testato per escludere contaminazione virale seguendo la procedura CFR Titolo 9 Parte 113.53. È stato anche testato per determinare eventuali contaminazioni da micoplasma. CHANG Medium MF è stato sterilizzato per filtrazione mediante filtro da 0,1 micron. Campioni di CHANG Medium MF sono stati testati per escludere eventuale contaminazione batteriologica seguendo il protocollo delle prove di sterilità descritto nel corrente test di sterilità USP <71>.

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 Medium MF è stato testato utilizzando sangue periferico per valutare l'indice mitotico, la lunghezza e la qualità dei cromosomi confrontandolo con un terreno di controllo. I risultati sono riportati nel Certificato di analisi specifico di ogni lotto.

MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI MA NON FORNITI

1. Fitoemagglutinina (PHA) soluzione sterile (9 mg/ml)
2. Eparina priva di fenolo
3. Soluzione di Colcemid 25 µg/ml
4. Soluzione di cloruro di potassio, 75 mM
5. Alcol acetico, 1 parte di acido acetico glaciale: 3 parti di metanolo (reagente di classe analitica)
6. Giemsa o acido acetico-orceina 2%
7. Acido cromico
8. Montante
9. Vetrini e coprioggetti
10. Provette in plastica per centrifuga
11. Incubatore con CO_2
12. Centrifuga da banco
13. Miscelatore Vortex
14. Microscopio ottico

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il buon esito delle colture di sangue intero per l'analisi citogenetica dipende dal livello di linfociti con funzionalità normale al momento del campionamento. Dato che questo livello può essere alterato da infezioni e farmaci, ove possibile i soggetti che si sottopongono ad analisi citogenetica dovranno evitare di assumere farmaci nei 7 giorni precedenti il prelievo di sangue per il test. Analogamente, l'indice mitotico può ridursi in modo significativo durante le fasi anergiche di alcune patologie (ad es. la malattia di Hodgkin, la sarcoidosi, ecc.) e, in misura minore, in donne sane nelle ultime fasi della gravidanza. Non aggiungere conservanti ai campioni di sangue prelevati per coltura linfocitica. È indispensabile operare con tecniche in asepsi.

I campioni devono essere analizzati il prima possibile. Qualora fosse assolutamente necessario, potranno essere conservati a 2-8 °C per non più di 48 ore.

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.

Nota – La formazione di cristalli di carbonato di calcio in CHANG Medium MF è un fenomeno normale. La presenza di questi cristalli non ha evidenziato effetti negativi sulle prestazioni del prodotto.

ISTRUZIONI PER L'USO

Negli studi citogenetici sono stati usati sia sangue intero che leucociti separati, tuttavia il primo rappresenta il sistema più semplice e più diffuso nella routine. Come per qualsiasi coltura cellulare, i risultati ottimali dipendono dalla creazione di condizioni colturali adeguate. Poiché il contenuto relativo di PHA attiva può variare leggermente nei diversi lotti, potrebbe essere utile eseguire l'esame su due concentrazioni della sostanza.

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.

I. Preparazione del campione

Prelevare 5-10 ml di sangue appena raccolto in eparina sodica per i pazienti adulti, e 2-3 ml per i pazienti pediatrici.

- Eventuale sangue intero deve essere utilizzato a temperatura ambiente e miscelato mediante inversione.
- I linfociti da sangue intero possono essere stimolati con fitoemagglutinina (PHA) e la coltura può essere eseguita con una tecnica di sincronizzazione.

II. Coltura di sangue intero

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

1. Prima di inoculare il campione, portare CHANG Medium MF a temperatura ambiente.
2. Ricostituire la PHA aggiungendovi con una siringa sterile 5 ml di acqua distillata sterile.
3. Con tecnica asettica, preparare i 5 ml necessari di CHANG Medium MF per ciascun contenitore colturale.
4. Aggiungere 0,1 ml di PHA ricostituita per contenitore colturale.
5. Inoculare 0,3 ml di campione per coltura. Se il paziente è un neonato (<1 mese di età), inoculare 0,2 ml di campione.
6. Ogni laboratorio dovrà determinare il numero di colture da predisporre, in funzione delle indicazioni cliniche e dell'età del paziente. Su campioni biologici di neonati (<1 mese di età) occorre iniziare un'ulteriore coltura di 48 ore, senza sincronizzazione.
7. Incubare le colture a 35-39 °C, in atmosfera al 5-8% di CO_2, finché non sono pronte per la raccolta.
8. Ai fini della sincronizzazione: dopo 48 ore di incubazione, aggiungere 50 µl di soluzione di lavoro di metotressato a ogni coltura da 5 ml da raccogliere dopo 72 ore. Aggiungere 100 µl di soluzione di lavoro di timidina a ciascuna coltura da 5 ml 18-19 ore dopo aver aggiunto metotressato (5-6 ore prima della raccolta).

III. 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 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 8-10 per ogni provetta.
13. Lasciare le provette in un bagno d'acqua a 35-37 °C. Capovolgerle a metà dell'intervallo di 20 minuti sul cronometro.
14. Alla fine dell'intervallo di 20 minuti sul cronometro, aggiungere in ciascuna provetta 1 ml di fissativo di Carnoy 3:1 appena preparato. 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 sia 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 scarto.
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 16-18 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 23-24 (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.

APPLICAZIONI CLINICHE

Il numero modale dei cromosomi umani è 46. I cromosomi umani sono stati classificati in base alla loro lunghezza e alla posizione del centromero (classificazione di Denver). Aberrazioni costituzionali dei cromosomi sono state associate a molte malattie congenite come la sindrome di Down (tipicamente con un autosoma piccolo aggiuntivo) e sindromi collegate all'indeterminazione della sessualità (sindrome di Turner, sindrome di Klinefelter e altre, caratterizzate da anomalia dei cromosomi sessuali). Un'anomalia cromosomica acquisita può essere rilevata in una parte dei leucociti nella leucemia mielocitica cronica (il cromosoma "Philadelphia"); inoltre seguendo questo marcatore è possibile valutare i progressi del trattamento. Quando la radioterapia si avvicina al limite di tolleranza, si osserva un notevole aumento della proporzione di cellule con anomali corredi cromosomici; l'aspetto di tali cellule è stato utilizzato come guida per modulare il dosaggio.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare CHANG Medium MF congelato a temperatura inferiore a -10 °C fino al momento dell'uso. Se conservato congelato, il prodotto 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 (non oltre due volte) 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 Medium MF contiene 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 Medium MF es un medio exento de mitógenos, listo para usar y diseñado para utilizarse en el cultivo de sangre periférica y otras muestras para análisis citogenéticos.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El CHANG Medium MF está compuesto por RPMI que contiene 20 % de FBS, glutamina 2 mM, tampón HEPES 20 mM y el antibiótico sulfato de gentamicina. Es posible que sea necesario añadir agentes mitógenos, como fitohemaglutinina (PHA), para optimizar el crecimiento de las células de la sangre periférica y otras. La concentración requerida de PHA (u otros mitógenos) la determinará cada laboratorio.

COMPONENTES

Aminoácidos

Arginina
Asparagina
Ácido aspártico
Cistina
Ácido glutámico
Glutamina
Glicina
Histidina
Isoleucina
Leucina
Lisina
Metionina
Fenilalanina
Prolina
Serina
Treonina
Triptófano
Tirosina
Valina

Agua

Calidad de agua para inyectables

Proteínas, hormonas y factores de crecimiento

Suero bovino fetal (FBS)

Indicador del pH

Rojo de fenol

Otros

Biotina
Hidroxiprolina
Glutatión

Sistemas tampón

Bicarbonato sódico
HEPES

Sustratos energéticos

Glucosa
Inositol

Sales e iones

Cloruro sódico
Cloruro de colina
Nitrato cálcico
Cloruro potásico
Sulfato magnésico
Fosfato sódico

Antibiótico

Sulfato de gentamicina

Vitaminas y oligoelementos

Ácido fólico
Nicotinamida
Riboflavina
Tiamina
Ácido pantoténico
Cobalamina
Piridoxina
Ácido aminobenzoico

GARANTÍA DE CALIDAD

ESTERILIDAD

El suero utilizado en la producción del CHANG Medium MF se ha sometido a análisis de contaminación viral de acuerdo con el título 9 del CFR, parte 113.53. Asimismo se ha cribado la contaminación por micoplasmas. El CHANG Medium MF se esteriliza por filtración a través de un filtro de 0,1 µm. Se analizan muestras del CHANG Medium MF para detectar la posible contaminación bacteriana según el protocolo analítico de esterilidad descrito en el vigente ensayo de esterilidad <71> de la USP.

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.

Cada lote del CHANG Medium MF se evalúa frente a un medio de control analizando el índice mitótico, la longitud cromosómica y la calidad con muestras de sangre periférica. Los resultados se notifican en un certificado de análisis específico del lote.

MATERIAL Y EQUIPO NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Solución de fitohemaglutinina (PHA) (9 mg/ml), estéril
2. Heparina sin fenol
3. Solución Colcemid, 25 µg/ml
4. Solución de cloruro potásico, 75 mM
5. Alcohol acético, 1 parte de ácido acético glacial: 3 partes de metanol (calidad para reactivo analítico)
6. Giemsa u orceína acética al 2 %
7. Ácido crómico
8. Fijador
9. Portaobjetos y cubreobjetos
10. Tubos de centrífuga de plástico
11. Incubadora de CO_2
12. Centrífuga de mesa
13. Agitador vórtex
14. Microscopio óptico

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

El éxito de los cultivos de sangre total para el análisis citogenético depende de la cantidad de linfocitos con función normal en el momento del muestreo. Como esta cantidad se ve afectada por infecciones y medicamentos, siempre que sea posible los sujetos sometidos a estudios citogenéticos no tomar medicamentos durante los 7 días anteriores a la extracción de sangre para el análisis. Del mismo modo, el índice mitótico puede disminuir de forma considerable durante las fases anérgicas de ciertas enfermedades (p. ej., enfermedad de Hodgkin, sarcoidosis, etc.) y, en menor medida, durante las últimas etapas de un embarazo normal. No se debe añadir conservante a las muestras de sangre para el cultivo de linfocitos. Las técnicas asépticas son esenciales.

Las muestras de sangre deben analizarse sin demora siempre que sea posible. Si es absolutamente necesario, se pueden conservar a 2-8 °C durante 48 horas como máximo.

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.

Nota: en el CHANG Medium MF se forman con frecuencia cristales de oxalato cálcico. No se ha demostrado que la presencia de estos cristales merme el rendimiento del producto.

INSTRUCCIONES DE USO

En los estudios citogenéticos se han utilizado sangre total o leucocitos separados pero la primera es más sencilla y se utiliza más en los estudios sistemáticos. Como sucede con cualquier procedimiento de cultivo celular, los resultados óptimos solo se obtienen en condiciones de cultivo adecuadas. Dado que el contenido relativo de PHA activo varía ligeramente entre un lote y otro, vale la pena analizar dos concentraciones de PHA.

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.

I. Preparación de la muestra:

Obtener sangre fresca en heparina sódica (5-10 ml en el caso de adultos, 2-3 ml en el caso de pacientes pediátricos).

- La sangre total debe transportarse a temperatura ambiente y mezclarse por inversión.
- Pueden estimularse los linfocitos de la sangre total con fitohemaglutinina (PHA) y pueden cultivarse empleando una técnica de sincronización.

II. Cultivo de sangre total:

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 Medium MF alcance la temperatura ambiente.
2. Reconstituir la PHA añadiendo 5 ml de agua destilada estéril con una jeringa estéril.
3. Preparar los 5 ml de CHANG Medium MF necesarios para cada recipiente de cultivo empleando una técnica aséptica.
4. Añadir 0,1 ml de PHA reconstituida por recipiente de cultivo.
5. Inocular 0,3 ml de muestra por cultivo. Si el paciente es un lactante (<1 mes de edad), inocular 0,2 ml de muestra.
6. Cada laboratorio determinará el número requerido de cultivos dependiendo de la indicación clínica y la edad del paciente. Deberá iniciarse un cultivo adicional de 48 horas en muestras de recién nacidos (<1 mes de edad) sin sincronización.
7. Incubar los cultivos a 35-39 °C en una atmósfera con 5-8 % de CO_2 hasta que se encuentren listos para la cosecha.
8. Para la sincronización: Tras 48 horas de incubación, añadir 50 µl de solución de trabajo de metrotexato por cada 5 ml de cultivo para cosechar a las 72 horas. Añadir 100 µl de solución de trabajo de timidina por cada 5 ml de cultivo 18-19 horas después de añadir metotrexato (5-6 horas antes de la cosecha).

III. 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. Tapar herméticamente los tubos y mezclar 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 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 8-10 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 finalizar dicho periodo de 20 minutos, 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 obtener un volumen total de 7 ml.
20. Repetir los pasos 16-18 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 obtener un volumen total de 7 ml. Centrifugar los tubos durante 8 minutos a 1000 rpm. (Segundo paso fijador).
25. Repetir los pasos 23-24. (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.

APLICACIONES CLÍNICAS

El número modal de cromosomas humanos es 46. Los cromosomas humanos se han clasificado según su longitud y la posición del centrómero (clasificación de Denver). Las aberraciones de la dotación cromosómica se han asociado con una serie de trastornos congénitos como el síndrome de Down (de ordinario, con un pequeño autosoma adicional) y síndromes asociados con estados sexuales indeterminados (síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter y otros con anomalías de los cromosomas sexuales). En un porcentaje de leucocitos de la leucemia mielocítica crónica se detecta una anomalía cromosómica adquirida (el cromosoma «Filadelfia») y los progresos terapéuticos se pueden evaluar vigilando este marcador. Según se acerca el límite de tolerancia en la radioterapia, se advierte un marcado aumento en el porcentaje de células con una dotación cromosómica extraña; la aparición de estas células se ha utilizado como guía posológica.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Conservar el CHANG Medium MF congelado, a menos de -10 °C, hasta que esté listo para su uso. Si se conserva congelado, el CHANG Medium MF 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 (como máximo, dos veces) 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 Medium MF contiene FBS y se debe manipular con las precauciones universales de laboratorio. El medio contiene un antibiótico (sulfato de 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 Medium MF est un milieu non mitogène prêt à l'emploi destiné à être utilisé dans la culture des échantillons de sang périphérique et d'autres échantillons aux fins d'analyse cytogénétique.

DESCRIPTION DU DISPOSITIF

CHANG Medium MF est composé de RPMI contenant 20 % de SVF, 2 mM de glutamine, 20 mM de tampon d'HEPES et de sulfate de gentamicine (antibiotique). Il peut nécessiter l'ajout d'agents mitogènes comme la phytohémagglutinine (PHA) pour optimiser la croissance des cellules de sang périphérique et d'autres cellules. La concentration requise de PHA (ou d'autres mitogènes) doit être déterminée par chaque laboratoire.

COMPOSANTS

Acides aminés

Arginine
Asparagine
Acide aspartique
Cystine
Acide glutamique
Glutamine
Glycine
Histidine
Isoleucine
Leucine
Lysine
Méthionine
Phénylalanine
Proline
Sérine
Thréonine
Tryptophane
Tyrosine
Valine

Eau

Qualité WFI

Protéines, hormones et facteurs de croissance

Sérum de veau fœtal (SVF)

Indicateur de pH

Rouge de phénol

Autre

Biotine
Hydroxyproline
Glutathione

Tampons

Bicarbonate de sodium
HEPES

Substrats énergétiques

Glucose
Inositol

Sels et ions

Chlorure de sodium
Chlorure de choline
Nitrate de calcium
Chlorure de potassium
Sulfate de magnésium
Phosphate de sodium

Antibiotique

Sulfate de gentamicine

Vitamines et oligo-éléments

Acide folique
Nicotinamide
Riboflavine
Thiamine
Acide pantothénique
Cobalamine
Pyridoxine
Acide aminobenzoïque

ASSURANCE QUALITÉ

STÉRILITÉ

Le sérum utilisé dans la fabrication de CHANG Medium MF a été testé pour les contaminations virales selon le code des réglementations fédérales CFR Title 9 Part 113.53. Il a été aussi testé pour les contaminations par mycoplasme. CHANG Medium MF est stérilisé par filtration avec un filtre de 0,1 µm. Des échantillons de CHANG Medium MF sont testés pour une éventuelle contamination bactérienne selon le protocole de test de stérilité décrit dans le test de stérilité courant de la pharmacopée américaine (USP) <71>.

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 matériau de référence présentant une activité appropriée connue avant de commencer à utiliser le milieu de façon régulière.

L'indice mitotique, la longueur des chromosomes et la qualité de chaque lot de CHANG Medium MF sont évalués par comparaison à un milieu témoin. Les résultats sont rapportés dans un certificat d'analyses spécifique à chaque lot.

MATÉRIAUX ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

1. Solution de phytohémagglutinine (PHA) (9 mg/ml), stérile
2. Héparine sans phénol
3. Solution de Colcemid (25 µg/ml)
4. Solution de chlorure de potassium, 75 mM
5. Alcool acétique, 1 part d'acide acétique glacial/3 parts de méthanol (qualité réactive)
6. Colorant Giemsa ou acide acétique/orcéine à 2 %
7. Acide chromique
8. Milieu de montage
9. Lames et lamelles en verre
10. Tubes de centrifugation en plastique
11. Incubateur à CO_2
12. Centrifugeuse de table
13. Vortex
14. Microscope optique

COLLECTE ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS

Le taux de lymphocytes normaux au moment du prélèvement des échantillons influence les résultats de l'analyse cytogénétique des cultures de sang total. Ce taux pouvant être influencé par l'infection et les médicaments, il est recommandé aux sujets participant à des études cytogénétiques de ne pas prendre de médicaments, si possible, pendant les 7 jours précédant la collecte des échantillons sanguins en vue de tests. De la même manière, l'indice mitotique peut être réduit considérablement pendant les phases anergiques de certaines maladies (p. ex. maladie de Hodgkin, sarcoïdose, etc.) et, à moindre degré, chez les femmes saines au cours des derniers stades de la grossesse. Ne pas ajouter de conservateur aux échantillons sanguins pour la culture lymphocytaire. L'utilisation de techniques aseptiques est essentielle.

Les échantillons sanguins doivent être testés sans délai dans la mesure du possible. Ils peuvent être conservés entre 2 et 8 °C pendant 48 heures maximum, en cas de nécessité absolue.

PRÉPARATION

Décongeler jusqu'au lendemain dans un réfrigérateur (entre 2 et 8 °C), puis mélanger délicatement pour assurer 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.

Remarque : des cristaux de carbonate de calcium se forment en général dans CHANG Medium MF. Il n'a pas été démontré que la présence de ces cristaux compromet les performances du produit.

MODE D'EMPLOI

Du sang total ou des leucocytes séparés ont été utilisés pour les études cytogénétiques, mais le sang total est la méthode la plus simple et la plus largement utilisée dans les études courantes. Comme dans toute mise en culture de cellules, les résultats optimaux dépendent de l'établissement de conditions adéquates. Le contenu relatif de la solution de PHA active pouvant varier légèrement d'un lot à un autre, il peut être avantageux de tester deux concentrations différentes.

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.

I. Préparation des échantillons :

Prélever du sang frais dans de l'héparine sodique à raison de 5 à 10 ml pour les adultes et de 2 à 3 ml pour les enfants.

- Le sang total doit être prélevé à température ambiante et mélangé par retournement.
- Les lymphocytes du sang total peuvent être stimulés avec la phytohémagglutinine (PHA) et peuvent être cultivés avec une technique de synchronisation.

II. Culture du sang total :

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 Medium MF à température ambiante.
2. Reconstituer la PHA en ajoutant 5 ml d'eau distillée stérile à l'aide d'une seringue stérile.
3. Préparer le volume requis de 5 ml de CHANG Medium MF nécessaire pour chaque flacon de culture à l'aide d'une technique aseptique.
4. Ajouter 0,1 ml de PHA reconstituée par flacon de culture.
5. Inoculer 0,3 ml d'échantillon par culture. Si le patient est un nourrisson (< 1 mois), inoculer avec 0,2 ml d'échantillon.
6. Chaque laboratoire doit déterminer le nombre de cultures à préparer en fonction de l'indication clinique et de l'âge du patient. Une culture supplémentaire de 48 heures doit être commencée sur les échantillons de nouveau-nés (< 1 mois) sans synchronisation.
7. Incuber les cultures entre 35 et 39 °C dans une atmosphère contenant entre 5 et 8 % de CO_2 jusqu'à ce qu'elles soient prêtes pour la collecte.
8. Pour la synchronisation : après 48 heures d'incubation, ajouter 50 µl de solution de travail de méthotrexate par 5 ml à chaque culture à collecter à 72 heures. Ajouter 100 µl de solution de travail de thymidine par 5 ml à chaque culture entre 18 et 19 heures après l'ajout du méthotrexate (5 à 6 heures avant la collecte).

III. 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 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 8 à 10 pour chaque tube.
13. Laisser les tubes reposer dans un bain-marie entre 35 et 37 °C. Retourner les tubes une fois au milieu de la minuterie de 20 minutes.

14. Ajouter 1 ml de solution de fixation de Carnoy fraîche au 3:1 à chaque tube à la fin de la minuterie de 20 minutes. 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 de la solution de fixation jusqu'à un volume final de 7 ml.
20. Répéter les étapes 16 à 18 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 23 à 24. (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.

APPLICATIONS CLINIQUES

Le nombre modal de chromosomes humains est 46. Les chromosomes humains sont classés en fonction de leur longueur et de la position de leur centromère (Classification de Denver). Les aberrations chromosomiques sont associées à un certain nombre de troubles congénitaux, tels que la trisomie (avec en général un autre petit autosome supplémentaire) et les syndromes associés à une sexualité indéterminée (syndrome de Turner, syndrome de Klinefelter, etc. où les chromosomes sexuels sont anormaux). Une anomalie chromosomique acquise peut être détectée dans une partie des leucocytes dans la leucémie myélocytaire chronique (le chromosome « Philadelphie ») et les progrès du traitement peuvent être évalués en suivant ce marqueur. À l'approche de la limite de tolérance à la radiothérapie, on observe une augmentation marquée de la proportion des cellules présentant une structure chromosomique anormale et l'apparence de ces cellules est utilisée comme guide posologique.

CONSERVATION ET STABILITÉ

Conserver CHANG Medium MF congelé, en dessous de -10 °C, jusqu'à ce qu'il soit prêt à être utilisé. CHANG Medium MF 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 entamé peut être réparti dans des aliquotes de travail et recongelé (deux fois maximum) pour une utilisation ultérieure, ou son flacon fermé 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 Medium MF contient du SVF 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 Medium MF é um meio isento de agentes mitogénicos, pronto a utilizar, na cultura de sangue periférico e de outros espécimes para fins de análise citogenética.

DESCRIÇÃO DO DISPOSITIVO

O CHANG Medium MF é constituído por RPMI contendo FBS a 20%, glutamina 2 mM, tampão HEPES 20 mM e o antibiótico sulfato de gentamicina. Pode ser necessário adicionar agentes mitogénicos, como a fito-hemaglutinina (PHA), para otimizar o crescimento de células do sangue periférico e de outras células. A concentração de PHA (ou outros agentes mitogénicos) necessária deve ser determinada por cada laboratório.

COMPONENTES

Aminoácido

Arginina
Asparagina
Ácido aspártico
Cistina
Ácido glutâmico
Glutamina
Glicina
Histidina
Isoleucina
Leucina
Lisina
Metionina
Fenilalanina
Prolina
Serina
Treonina
Triptofano
Tirosina
Valina

Água

Qualidade WFI (água p/ preparações injetáveis)

Proteínas, hormonas e fatores de crescimento

Soro bovino fetal (FBS)

Indicador de pH

Vermelho de fenol

Outro

Biotina
Hidroxiprolina
Glutationa

Tampões

Bicarbonato de sódio
HEPES

Substratos energéticos

Glucose
Inositol

Sais e iões

Cloreto de sódio
Cloreto de colina
Nitrato de cálcio
Cloreto de potássio
Sulfato de magnésio
Fosfato de sódio

Antibiótico

Sulfato de gentamicina

Vitaminas e oligoelementos

Ácido fólico
Nicotinamida
Riboflavina
Tiamina
Ácido pantoténico
Cobalamina
Piridoxina
Ácido aminobenzoico

GARANTIA DE QUALIDADE

ESTERILIDADE

O soro utilizado na produção do CHANG Medium MF foi testado em relação a contaminação viral de acordo com a norma CFR Título 9 Parte 113.53. Foi igualmente submetido a rastreio de contaminação por micoplasmas. O CHANG Medium MF foi esterilizado por filtração através de um filtro de 0,1 µm. Foram testadas amostras de CHANG Medium MF quanto a possível contaminação bacteriológica, seguindo o protocolo para testes de esterilidade do capítulo <71> da versão atual da USP (Farmacopeia dos EUA).

O resultado obtido pode ser influenciado por vários fatores que incluem a origem da amostra, 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.

Cada lote de CHANG Medium MF é avaliado utilizando sangue periférico relativamente ao índice mitótico e ao comprimento e à qualidade dos cromossomas, 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

1. Solução de fito-hemaglutinina (PHA) (9 mg/ml), estéril
2. Heparina sem fenol
3. Solução de colcemid 25 µg/ml
4. Solução de cloreto de potássio, 75 mM
5. Álcool acético, 1 parte de ácido acético glacial: 3 partes de metanol (categoria de reagente analítico)
6. Giemsa ou ácido acético a 2%-orceína
7. Ácido crómico
8. Meio de montagem
9. Lâminas e lamelas de vidro
10. Tubos de centrifugadora de plástico
11. Incubadora de CO_2
12. Centrifugadora de bancada
13. Misturador de vórtice
14. Microscópio ótico

COLHEITA E MANUSEAMENTO DE ESPÉCIMES

O êxito das culturas de sangue total para análise citogenética é influenciado pelo nível de linfócitos com função normal no momento da colheita de amostras. Como este nível pode ser influenciado por infeção e fármacos, sempre que possível, os participantes em estudos citogenéticos não devem tomar medicamentos durante 7 dias antes da colheita de sangue para testes. De igual modo, o índice mitótico pode ser bastante reduzido durante as fases anérgicas de certas doenças (p. ex., doença de Hodgkin, sarcoidose, etc.) e, em menor grau, em mulheres normais nas últimas fases da gravidez. Não se deve adicionar conservante a amostras de sangue para cultura de linfócitos. A assepsia das técnicas é fundamental.

Sempre que possível, as amostras de sangue devem ser testadas sem demora. Se for absolutamente necessário, podem ser conservadas entre 2 °C e 8 °C durante um período não superior a 48 horas.

PREPARAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO

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

Nota: A formação de cristais de carbonato de cálcio é frequente no CHANG Medium MF. A presença destes cristais não demonstrou causar qualquer efeito prejudicial no desempenho do produto.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Têm sido utilizados em exames citogenéticos em sangue total ou leucócitos separados, mas a primeira opção é a mais simples e amplamente utilizada em exames de rotina. Tal como qualquer procedimento de cultura de células, os resultados ideais dependem do estabelecimento de condições de cultura adequadas. Como o teor relativo de PHA ativo pode variar ligeiramente entre diferentes lotes, pode ser benéfico testar duas concentrações de PHA.

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.

I. Preparação da amostra:

Utilize 5–10 ml, no caso de adultos e 2–3 ml no caso de doentes pediátricos de sangue recém-colhido em heparina de sódio.

- O sangue total deverá ser transportado à temperatura ambiente e deverá ser misturado por inversão.
- Os linfócitos provenientes de sangue total podem ser estimulados com fito-hemaglutinina (PHA) e podem ser cultivados por meio de uma técnica de sincronização.

II. Cultura de sangue total:

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

1. Antes de proceder à inoculação do espécime, deixe o CHANG Medium MF atingir a temperatura ambiente.
2. Reconstitua a PHA, adicionando 5 ml de água destilada estéril com uma seringa estéril.
3. Utilizando uma técnica assética, prepare o volume necessário de 5 ml de CHANG Medium MF para cada um dos recipientes de cultura.
4. Adicione 0,1 ml de PHA reconstituída por cada recipiente de cultura.
5. Inocule 0,3 ml de amostra por cultura. Se o doente for um bebé (< 1 mês de idade), inocule com 0,2 ml de amostra.
6. Cada laboratório deve determinar o número de culturas a preparar dependendo da indicação clínica e da idade do doente. Deve iniciar-se uma cultura adicional de 48 horas em espécimes de recém-nascidos (< 1 mês de idade) sem sincronização.
7. Incube as culturas a 35 °C–39 °C, numa atmosfera de 5%–8% de CO_2 até estarem prontas para colheita.
8. Para a sincronização: Após as 48 horas de incubação, adicione 50 µl de solução de trabalho de metotrexato a cada 5 ml de cultura para realizar a colheita após 72 horas. Adicione 100 µl de solução de trabalho de timidina a cada 5 ml de cultura 18–19 horas após adicionar o metotrexato (5–6 horas antes da colheita).

III. Colheita de culturas:

1. Remova a cultura pronta para colheita da incubadora e gire suavemente o frasco para ressuspender as células.
2. Transfira o conteúdo de cada frasco de cultura para um tubo de centrifugadora de 15 ml.
3. 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.
4. Incube os tubos a 35 °C–39 °C durante 45 minutos.
5. Após a incubação, centrifugue os tubos durante 8 minutos a 1000 rpm.
6. Aspire cuidadosamente o sobrenadante de cada tubo, utilizando um aspirador com vácuo e coletor de solvente. Tenha cuidado para não aspirar o *pellet*.
7. Ressuspenda o *pellet*, batendo na parte inferior ou na parte lateral de cada tubo com um dedo.
8. Inicie um período de 20 minutos no temporizador.
9. Adicione 3–4 ml, gota a gota, de solução hipotónica pré-aquecida (35 °C–37 °C) (cloreto de potássio 0,075 mM).
10. Tape bem o tubo e misture suavemente, batendo na parte inferior ou na parte lateral do tubo com um dedo.
11. Adicione 5–6 ml, gota a gota, de solução hipotónica pré-aquecida (35 °C–37 °C). Tape bem o tubo e inverta-o.
12. Repita os passos 8 a 10 para cada tubo.
13. 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.
14. Adicione 1 ml de fixador de Carnoy recém-preparado, numa proporção de 3:1, a cada tubo depois de decorrida metade dos 20 minutos do temporizador. Tape bem o tubo e inverta cada um dos tubos. (Esta é a etapa de pré-fixação)
15. Centrifugue os tubos durante 8 minutos a 1000 rpm.

16. 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.
17. Ressuspenda o *pellet* de células, tal como descrito no passo 7.
18. Adicione 3–4 ml, gota a gota, de fixador de Carnoy recém-preparado, numa proporção de 3:1.
19. Adicione o restante fixador de modo que o volume total perfaça 7 ml.
20. Repita os passos 16 a 18 para cada tubo.
21. Deixe repousar à temperatura ambiente durante 10 minutos. (Esta é a primeira etapa de fixação)
22. Centrifugue os tubos durante 8 minutos a 1000 rpm.
23. Aspire o sobrenadante, deixando cerca de 1 ml acima do *pellet*. Ressuspenda o *pellet* de células.
24. Adicione o fixador até contabilizar 7 ml. Centrifugue os tubos durante 8 minutos a 1000 rpm. (Segunda etapa de fixação)
25. Repita os passos 23 a 24. (Terceira etapa de fixação)
26. 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.

APLICAÇÕES CLÍNICAS

O número modal de cromossomas humanos é 46. Os cromossomas humanos foram classificados de acordo com o seu comprimento e a posição do centrómero (Classificação de Denver). As aberrações da constituição cromossómica foram associadas a diversas doenças congénitas, como síndrome de Down (tipicamente com um pequeno autossoma adicional) e síndromes associadas a sexualidade indeterminada (síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter e outras, onde se verifica que os cromossomas sexuais são anómalos). Numa proporção de leucócitos na leucemia mielocítica crónica, é possível detetar uma anomalia cromossómica (o cromossoma “Filadélfia”), um marcador que pode ser utilizado para avaliar o progresso do tratamento. Como na radioterapia se fica próximo do limite de tolerância, há um aumento acentuado na proporção de células com constituição cromossómica bizarra, tendo o aspeto destas células sido utilizado como guia para a dosagem.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Conserve o CHANG Medium MF congelado a uma temperatura inferior a -10 °C, até estar pronto para utilizar. O CHANG Medium MF 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 dispensado em alíquotas de trabalho e recongelado (duas vezes no máximo) 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 Medium MF contém FBS e deve ser manuseado utilizando as precauções laboratoriais universais. O meio contém um antibiótico (sulfato de gentamicina) para reduzir o potencial de contaminação bacteriana; contudo, ao dispensar os meios, devem ser sempre utilizadas técnicas asséticas. Não utilize qualquer meio que não tenha cor vermelha.

ΕΛΛΗΝΙΚΑ

ΕΝΔΕΙΞΗ ΧΡΗΣΗΣ

Το CHANG Medium MF είναι ένα μέσο χωρίς μιτογόνο, έτοιμο για χρήση, το οποίο προορίζεται για χρήση στην καλλιέργεια περιφερικού αίματος και άλλων δειγμάτων με σκοπό την κυτταρογενετική ανάλυση.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ

Το CHANG Medium MF αποτελείται από RPMI που περιέχει 20% FBS, 2 mM γλουταμίνη, 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα HEPES και το αντιβιοτικό θειική γενταμυκίνη. Μπορεί να απαιτεί την προσθήκη μιτογόνων παραγόντων, όπως φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA) για βελτιστοποίηση της ανάπτυξης περιφερικού αίματος και λοιπών κυττάρων. Η απαιτούμενη συγκέντρωση PHA (ή άλλων μιτογόνων) θα πρέπει να καθορίζεται από το εκάστοτε εργαστήριο.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Αμινοξύ

Αργινίνη
Ασπαραγίνη
Ασπαρτικό οξύ
Κυστίνη
Γλουταμικό οξύ
Γλουταμίνη
Γλυκίνη
Ιστιδίνη
Ισολευκίνη
Λευκίνη
Λυσίνη
Μεθειονίνη
Φαινυλαλανίνη
Προλίνη
Σερίνη
Θρεονίνη
Τρυπτοφάνη
Τυροσίνη
Βαλίνη

Νερό

Ποιότητα ενέσιμου ύδατος (WFI)

Πρωτεΐνες, ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες

Ορός από έμβρυο βοοειδών (FBS)

Δείκτης pH

Ερυθρό της φαινόλης

Άλλα

Βιοτίνη
Υδροξυπρολίνη
Γλουταθειόνη

Ρυθμιστικά διαλύματα

Διττανθρακικό νάτριο
HEPES

Ενεργειακά υποστρώματα

Γλυκόζη
Ινοσιτόλη

Άλατα και ιόντα

Χλωριούχο νάτριο
Χλωριούχος χολίνη
Νιτρικό ασβέστιο
Χλωριούχο κάλιο
Θειικό μαγνήσιο
Φωσφορικό νάτριο

Αντιβιοτικό

Θειική γενταμυκίνη

Βιταμίνες και ιχνοστοιχεία

Φυλλικό οξύ
Νικοτιναμίδη
Ριβοφλαβίνη
Θειαμίνη
Παντοθενικό οξύ
Κοβαλαμίνη
Πυριδοξίνη
Αμινοβενζοϊκό οξύ

ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

ΣΤΕΙΡΟΤΗΤΑ

Ο ορός που χρησιμοποιείται στην παραγωγή του CHANG Medium MF έχει ελεγχθεί για ιογενή μόλυνση σύμφωνα με το CFR Title 9 Part 113.53. Έχει επίσης εξεταστεί για μόλυνση από μυκόπλασμα. Το CHANG Medium MF έχει αποστειρωθεί μέσω διήθησης με φίλτρο 0,1 μικρομέτρων. Δείγματα του CHANG Medium MF ελέγχονται για πιθανή βακτηριολογική μόλυνση, ακολουθώντας το πρωτόκολλο δοκιμασίας στειρότητας που περιγράφεται στην τρέχουσα δοκιμασία στειρότητας κατά USP <71>.

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 Medium MF αξιολογείται με χρήση περιφερικού αίματος για μιτωτικό δείκτη, μήκος χρωμοσωμάτων και ποιότητα, σε σύγκριση με μέσο μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε Πιστοποιητικό Ανάλυσης ειδικό ανά παρτίδα.

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

1. Διάλυμα φυτοαιμοσυγκολλητίνης (PHA) (9 mg/mL), αποστειρωμένο
2. Ηπαρίνη χωρίς φαινόλη
3. Διάλυμα κολσεμίδης 25 μg/mL
4. Διάλυμα χλωριούχου καλίου, 75 mM
5. Οξική αλκοόλη, 1 μέρος παγόμορφου οξικού οξέος: 3 μέρη μεθανόλης (τύπου αναλυτικού αντιδραστηρίου)
6. Giemsa ή 2% οξικό οξύ-ορκεΐνη
7. Χρωμικό οξύ
8. Μέσο έγκλεισης
9. Γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες και καλυπτρίδες
10. Πλαστικά σωληνάρια φυγόκεντρου
11. Επωαστήρας CO_2
12. Επιτραπέζια φυγόκεντρος
13. Αναμίκτης στροβιλισμού
14. Οπτικό μικροσκόπιο

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η επιτυχία καλλιεργειών ολικού αίματος για κυτταρογενετικές αναλύσεις επηρεάζεται από το επίπεδο λεμφοκυττάρων με κανονική λειτουργία κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας. Καθώς αυτό το επίπεδο μπορεί να επηρεαστεί από λοιμώξεις και φάρμακα, όπου είναι δυνατό, οι συμμετέχοντες σε κυτταρογενετικές μελέτες δεν θα πρέπει να έχουν λάβει φάρμακα για 7 ημέρες πριν από τη συλλογή αίματος για εξετάσεις. Παρομοίως, ο μιτωτικός δείκτης μπορεί να μειωθεί σημαντικά κατά τη διάρκεια ανεργικών φάσεων συγκεκριμένων ασθενειών (π.χ. νόσος Hodgkin, σαρκοείδωση, κ.λπ.) και, σε μικρότερο βαθμό, σε υγιή άτομα κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων εγκυμοσύνης. Δεν πρέπει να προστίθεται συντηρητικό στα δείγματα αίματος για καλλιέργεια λεμφοκυττάρων. Η τήρηση άσηπτων τεχνικών είναι πολύ σημαντική.

Τα δείγματα αίματος θα πρέπει να εξετάζονται χωρίς καθυστερήσεις, όπου αυτό είναι δυνατόν. Αν είναι απολύτως απαραίτητο, μπορούν να φυλαχτούν σε θερμοκρασία 2 °C έως 8 °C για όχι περισσότερο από 48 ώρες.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ

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

Σημείωση: Στο CHANG Medium MF σχηματίζονται συχνά κρύσταλλοι ανθρακικού ασβεστίου. Η παρουσία αυτών των κρυστάλλων δεν έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί οποιαδήποτε αρνητική επίδραση στην απόδοση του προϊόντος.

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

Στις κυτταρογενετικές μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί ολικό αίμα ή διαχωρισμένα λευκοκύτταρα, αλλά το πρώτο είναι το απλούστερο και πλέον διαδεδομένο σε μελέτες ρουτίνας. Όπως με κάθε διαδικασία κυτταρικής καλλιέργειας, τα βέλτιστα αποτελέσματα εξαρτώνται από τη διασφάλιση επαρκών συνθηκών καλλιέργειας. Επειδή το σχετικό περιεχόμενο ενεργού PHA μπορεί να διαφέρει ελαφρά μεταξύ διαφορετικών παρτίδων, ίσως είναι χρήσιμο να εξετάζονται δύο συγκεντρώσεις PHA.

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

I. Προετοιμασία δειγμάτων:

Συλλέξτε 5 - 10 mL φρέσκου αίματος σε ηπαρίνη νατρίου για ενήλικες και 2 - 3 mL για παιδιά.

- Το ολικό αίμα θα πρέπει να μεταφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και να αναμιγνύεται με αναστροφή.
- Τα λεμφοκύτταρα από το ολικό αίμα μπορούν να διεγερθούν με φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA) και μπορούν να καλλιεργηθούν με τεχνική συγχρονισμού.

II. Καλλιέργεια ολικού αίματος:

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

1. Πριν από τον ενοφθαλμισμό του δείγματος, φέρτε το CHANG Medium MF σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
2. Ανασυστήστε το PHA προσθέτοντας 5 mL αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη σύριγγα.
3. Με χρήση άσηπτης τεχνικής, προετοιμάστε τα απαιτούμενα 5 mL του CHANG Medium MF που είναι απαραίτητα για κάθε δοχείο καλλιέργειας.
4. Προσθέστε 0,1 mL ανασυσταμένου PHA ανά δοχείο καλλιέργειας.
5. Ενοφθαλμίστε 0,3 mL δείγματος ανά καλλιέργεια. Εάν ο ασθενής είναι βρέφος (ηλικίας <1 μηνός), ενοφθαλμίστε με 0,2 mL δείγματος.
6. Κάθε μεμονωμένο εργαστήριο θα πρέπει να προσδιορίσει τον αριθμό των καλλιεργειών που θα παρασκευάσει, ανάλογα με την κλινική ένδειξη και την ηλικία του ασθενούς. Σε δείγματα από νεογέννητα (ηλικίας <1 μηνός), θα πρέπει να εφαρμόζεται επιπρόσθετα καλλιέργεια 48 ωρών χωρίς συγχρονισμό.
7. Επωάστε τις καλλιέργειες στους 35 - 39 °C, σε ατμόσφαιρα 5 - 8% CO_2, έως ότου είναι έτοιμες για συλλογή.
8. Για τον συγχρονισμό: Μετά από επώαση 48 ωρών, προσθέστε 50 μL διαλύματος εργασίας μεθοτρεξάτης σε κάθε καλλιέργεια 5 mL που θα συλλεγεί στις 72 ώρες. Προσθέστε 100 μL, διαλύματος εργασίας θυμιδίνης σε κάθε καλλιέργεια 5 ml, 18 - 19 ώρες μετά την προσθήκη μεθοτρεξάτης (5 - 6 ώρες πριν από τη συλλογή).

III. Συλλογή καλλιεργειών:

1. Αφαιρέστε την καλλιέργεια που είναι έτοιμη για συλλογή από τον επωαστήρα και περιδινίστε το μπουκαλάκι με ήπιες κινήσεις, ώστε να επαναληφθεί η εναιώρηση των κυττάρων.
2. Μεταφέρετε το περιεχόμενο που έχει κάθε μπουκαλάκι σε σωληνάριο φυγοκέντρου των 15 mL.
3. Προσθέστε 40 μL αποθεματικού διαλύματος κολσεμίδης (10 μg/mL) σε κάθε σωληνάριο καλλιέργειας. Πωματίστε σφικτά τα σωληνάρια και αναμίξτε με ήπιες κινήσεις, με αναστροφή.
4. Επωάστε τα σωληνάρια στους 35 - 39 °C για 45 λεπτά.
5. Μετά την επώαση, φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια για 8 λεπτά στις 1.000 σ.α.λ.
6. Αναρροφήστε προσεκτικά το υπερκείμενο από κάθε σωληνάριο χρησιμοποιώντας αναρρόφηση κενού με παγίδα διαλύτη. Προσέξτε να μην αναρροφήσετε το συσσωμάτωμα.
7. Επαναλάβετε την εναιώρηση του συσσωματώματος κτυπώντας ελαφρά με το δάκτυλο τον πυθμένα ή το πλαϊνό τοίχωμα κάθε σωληναρίου.
8. Ξεκινήστε χρονομέτρηση 20 λεπτών.
9. Προσθέστε με μορφή σταγόνων 3 - 4 mL προθερμασμένου (στους 35 - 37 °C), υποτονικού διαλύματος (0,075 M χλωριούχου καλίου).

10. Πωματίστε σφικτά το σωληνάριο και αναμίξτε με ήπιες κινήσεις, κτυπώντας ελαφρά με το δάκτυλο τον πυθμένα ή το πλαϊνό τοίχωμα του σωληναρίου.
11. Προσθέστε με μορφή σταγόνων 5 - 6 mL προθερμασμένου (στους 35 - 37 °C), υποτονικού διαλύματος. Πωματίστε σφικτά το σωληνάριο και αναστρέψτε το σωληνάριο.
12. Επαναλάβετε τα βήματα 8 - 10 για κάθε σωληνάριο.
13. Χρησιμοποιώντας υδατόλουτρο, αφήστε τα σωληνάρια να έρθουν σε θερμοκρασία 35 - 37 °C. Αναστρέψτε μία φορά τα σωληνάρια στο μέσο της χρονομέτρησης 20 λεπτών.
14. Προσθέστε σε κάθε σωληνάριο 1 mL πρόσφατα παρασκευασμένου μέσου μονιμοποίησης Carnoy σε αναλογία 3:1, στο τέλος της χρονομέτρησης 20 λεπτών. Πωματίστε σφικτά και αναστρέψτε κάθε σωληνάριο. (Αυτό είναι το βήμα πριν από τη μονιμοποίηση)
15. Φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια για 8 λεπτά στις 1.000 σ.α.λ.
16. Αναρροφήστε το υπερκείμενο από κάθε σωληνάριο, αφήνοντας περίπου 1 mL πάνω από το κυτταρικό συσσωμάτωμα. Προσέξτε να μην αναρροφήσετε το συσσωμάτωμα. Προσέχετε το ινώδες υλικό που μπορεί να επεκταθεί από το κυτταρικό συσσωμάτωμα προς τα πάνω και μέσα στο υπερκείμενο υγρό μετά τη φυγοκέντριση. Τα τελευταία λίγα mL του υπερκείμενου 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 κάδο απορριμμάτων.
17. Επαναλάβατε την εναιώρηση του κυτταρικού συσσωματώματος, όπως περιγράφεται στο βήμα 7.
18. Προσθέστε με μορφή σταγόνων 3 - 4 mL πρόσφατα παρασκευασμένου μέσου μονιμοποίησης Carnoy σε αναλογία 3:1.
19. Προσθέστε το υπόλοιπο μέσο μονιμοποίησης έως τα 7 mL.
20. Επαναλάβετε τα βήματα 16 - 18 για κάθε σωληνάριο.
21. Αφήστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. (Αυτό είναι το πρώτο βήμα της μονιμοποίησης).
22. Φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια για 8 λεπτά στις 1.000 σ.α.λ.
23. Αναρροφήστε το υπερκείμενο αφήνοντας περίπου 1 mL πάνω από το συσσωμάτωμα. Επαναλάβατε την εναιώρηση του κυτταρικού συσσωματώματος.
24. Προσθέστε μέσο μονιμοποίησης έως τα 7 mL. Φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια για 8 λεπτά στις 1.000 σ.α.λ. (Δεύτερο βήμα μονιμοποίησης).
25. Επαναλάβετε τα βήματα 23 - 24. (Τρίτο βήμα μονιμοποίησης).
26. Σε αυτό το σημείο, τα μονιμοποιημένα κυτταρικά συσσωματώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμέσως για την προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών, σύμφωνα με το τυπικό πρωτόκολλο του εργαστηρίου ή να φυλαχθούν στο ψυγείο (σε θερμοκρασία 2 - 8 °C) ή στον καταψύκτη για μελλοντική χρήση.

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Ο αριθμός των δυνητικών ανθρώπινων χρωμοσωμάτων είναι 46. Τα ανθρώπινα χρωμοσώματα έχουν ταξινομηθεί σύμφωνα με το μήκος τους και τη θέση του κεντρομεριδίου (Ταξινόμηση Denver). Παρεκκλίσεις της σύστασης των χρωμοσωμάτων έχουν συσχετιστεί με έναν αριθμό συγγενών διαταραχών όπως το σύνδρομο Down (συνήθως με ένα επιπρόσθετο μικρό αυτόσωμο) και σύνδρομα που σχετίζονται με την απροσδιόριστη φυλετικότητα (σύνδρομο Turner, σύνδρομο Klinefelter και άλλα, όπου τα φυλετικά χρωμοσώματα παρουσιάζουν ανωμαλίες). Μια επίκτητη χρωμοσωμική ανωμαλία μπορεί να ανιχνευθεί σε ένα ποσοστό των λευκοκυττάρων στη χρόνια μυελοκυτταρική λευχαιμία (το χρωμόσωμα της «Φιλαδέλφειας») και η πρόοδος της θεραπείας μπορεί να αξιολογηθεί παρακολουθώντας αυτόν τον δείκτη. Καθώς στην ακτινοθεραπεία προσεγγίζει το όριο ανοχής, παρουσιάζεται αξιοσημείωτη αύξηση στο ποσοστό κυττάρων με περίεργη χρωμοσωμική σύσταση και η εμφάνιση αυτών των κυττάρων χρησιμοποιείται ως οδηγός για τη δοσολογία.

ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Φυλάσσετε το CHANG Medium MF κατεψυγμένο, κάτω από τους -10 °C, μέχρι να είστε έτοιμοι να το χρησιμοποιήσετε. Το CHANG Medium MF 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 επανακαταψυχθεί (το μέγιστο δύο φορές) για επακόλουθη χρήση ή να πωματιστεί σφικτά και να φυλαχθεί 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 Medium MF περιέχει FBS και ο χειρισμός του θα πρέπει να γίνεται με τη λήψη των γενικών εργαστηριακών προφυλάξεων. Το μέσο περιέχει ένα αντιβιοτικό (θειική γενταμυκίνη) για τη μείωση της πιθανότητας βακτηριακής μόλυνσης, αλλά θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πάντοτε άσηπτες τεχνικές κατά τη διανομή του μέσου. Μη χρησιμοποιείτε κανένα μέσο που δεν έχει κόκκινο χρώμα.

ČEŠTINA

INDIKACE PRO POUŽITÍ

CHANG Medium MF je médium bez obsahu mitogenů připravené k použití při kultivaci periferní krve a jiných vzorků pro účely cytogenetické analýzy.

POPIS PROSTŘEDKU

CHANG Medium MF se skládá z RPMI o obsahu 20 % FBS, 2 mM glutaminu, 20 mM pufru HEPES a antibiotika gentamicin-sulfátu. K optimalizaci růstu buněk periferní krve a jiných buněk do něj může být potřeba přidat mitogenní činidla, jako např. fytohemaglutinin (PHA). Požadovanou koncentraci PHA (nebo jiných mitogenů) stanoví jednotlivé laboratoře.

SLOŽKY

Aminokyselina

Arginin
Asparagin
Kyselina asparagová
Cystin
Kyselina glutamová
Glutamin
Glycin
Histidin
Isoleucin
Leucin
Lysin
Methionin
Fenylalanin
Prolin
Serin
Threonin
Tryptofan
Tyrosin
Valin

Voda

V kvalitě vody pro injekci

Proteiny, hormony a růstové faktory

Fetální bovinní sérum (FBS)

Indikátor pH

Fenolová červeň

Ostatní

Biotin
Hydroxyprolin
Glutathion

Pufry

Hydrogenuhličitan sodný
HEPES

Energetické substráty

Glukóza
Inositol

Soli a ionty

Chlorid sodný
Cholinchlorid
Dusičnan vápenatý
Chlorid draselný
Síran hořečnatý
Fosforečnan sodný

Antibiotikum

Gentamicin-sulfát

Vitaminy a stopové prvky

Kyselina listová
Nikotinamid
Riboflavin
Thiamin
Kyselina pantothenová
Kobalamin
Pyridoxin
Kyselina aminobenzoová

ZAJIŠTĚNÍ KVALITY

STERILITA

Sérum používané k výrobě CHANG Medium MF bylo testováno na přítomnost virové kontaminace podle předpisů CFR hlava 9 část 113.53. Byl také proveden screening na kontaminaci mykoplazmaty. CHANG Medium MF je sterilizováno filtrací o jemnosti 0,1 mikronu. Vzorky CHANG Medium MF jsou testovány na možnou bakteriální kontaminaci podle protokolu testování sterility popsaného v aktuálně používaném testu na kontrolu sterility podle lékopisu USA <71>.

Dosažené výsledky může ovlivnit několik faktorů včetně zdroje vzorku, 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.

Každá šarže CHANG Medium MF je pomocí periferní krve vyhodnocena na mitotický index a délku a kvalitu chromozomů ve srovnání s kontrolním médiem. Výsledky jsou uvedeny v analytickém certifikátu k příslušné šarži.

POTŘEBNÉ NEDODÁVANÉ MATERIÁLY A VYBAVENÍ

1. Roztok fytohemaglutininu (PHA) (9 mg/ml), sterilní
2. Heparin bez obsahu fenolu
3. Roztok Colcemid 25 µg/ml
4. Roztok chloridu draselného, 75 mM
5. Octový alkohol, 1 díl kyseliny octové ledové : 3 díly methanolu (kvality analytické reagencie)
6. Giemsa nebo 2% kyselina octová-orcein
7. Kyselina chromová
8. Fixační prostředek
9. Podložní sklíčka a krycí sklíčka
10. Plastové centrifugační zkumavky
11. CO_2 inkubátor
12. Stolní centrifuga
13. Třepačka vortex
14. Světelný mikroskop

ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE S NIMI

Úspěšnost kultivace plné krve pro cytogenetické analýzy je ovlivněna množstvím lymfocytů s normální funkcí v době odběru vzorku. Vzhledem k tomu, že množství lymfocytů mohou ovlivňovat infekce a užívané léky, pacientka absolvující cytogenetické vyšetření by pokud možno neměla žádné léky užívat po dobu 7 dní před odběrem krve k vyšetření. Mitotický index může být také výrazně snížen během anergické fáze některých chorob (například Hodgkinova choroba, sarkoidóza atd.) a částečně také u normálních jedinců v pozdějších fázích těhotenství. Do krevních vzorků pro lymfocytové kultury nesmí být přidány žádné konzervační látky. Je nezbytné používat aseptické techniky.

Kdykoli je to možné, zajistěte okamžité zpracování krevních vzorků. Pokud je to absolutně nezbytné, vzorky lze po dobu maximálně 48 hodin uchovávat při teplotě 2–8 °C.

PŘÍPRAVA K POUŽITÍ

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

Poznámka: V médiu CHANG Medium MF se běžně tvoří krystalky uhličitanu vápenatého. Nebylo prokázáno, že by přítomnost těchto krystalků měla jakýkoli negativní účinek na funkci výrobku.

NÁVOD K POUŽITÍ

K cytogenetickému vyšetření se používá plná krev nebo separované leukocyty, použití plné krve je však jednodušší a pro běžná vyšetření nejčastější. Stejně jako u jiných kultivací buněk závisí optimální výsledky i zde na zajištění přiměřených kultivačních podmínek. Vzhledem k tomu, že relativní obsah aktivního PHA může v různých šaržích mírně kolísat, může být vhodné vyzkoušet dvě různé koncentrace PHA.

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

I. Příprava vzorku:

Získejte 5–10 ml čerstvé krve v heparinu sodném pro dospělé a 2–3 ml pro pediatrické pacienty.

- Plná krev se převáží při pokojové teplotě a promíchá se převracením.
- Lymfocyty z plné krve lze stimulovat fytohemaglutininem (PHA) a kultivovat synchronizační metodou.

II. Kultivace plné krve:

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

1. Před inokulací vzorkem nechte CHANG Medium MF dosáhnout teploty prostředí.
2. Rekonstituujte PHA přidáním 5 ml sterilní destilované vody sterilní stříkačkou.
3. Asepticky technikou připravte potřebný objem CHANG Medium MF; pro každou kultivační nádobku je potřeba 5 ml.
4. Do každé kultivační nádobky přidejte 0,1 ml rekonstituovaného PHA.
5. Každou kulturu inokulujte 0,3 ml vzorku. Pokud je pacient novorozenec (věk < 1 měsíc), inokulujte 0,2 ml vzorku.
6. Každá laboratoř si podle klinické indikace a věku pacienta stanoví počet kultur, které je třeba připravit. U vzorků novorozenců (věk < 1 měsíc) se založí dodatečná 48 hodinová kultura bez synchronizace.
7. Kultury inkubujte při teplotě 35–39 °C v atmosféře s 5–8 % CO_2, dokud nebudou připraveny ke sběru.
8. Synchronizace: Po 48 hodinách inkubace přidejte 50 µl pracovního roztoku methotrexátu do každých 5 ml kultury určené ke sběru v 72 hodinách. 18–19 hodin pro přidání methotrexátu (5–6 hodin před sběrem) přidejte do každých 5 ml kultury 100 µl pracovního roztoku thymidinu.

III. Sběr kultur:

1. Vyjměte kulturu připravenou ke sběru z inkubátoru a jemným zakroužením lahví resuspendujte buňky.
2. Přeneste obsah každé lahve do 15ml centrifugační zkumavky.
3. Do každé kultivační zkumavky přidejte 40 µl zásobního roztoku Colcemid (10 µg/ml). Zkumavky těsně zazátkujte a převrácením jemně promíchejte.
4. Zkumavky inkubujte 45 minut při teplotě 35–39 °C.
5. Po inkubaci zkumavky odstřeďte po dobu 8 minut na 1 000 ot./min.
6. Opatrně z každé zkumavky aspirujte supernatant; použijte podtlakový aspirátor s odlučovačem rozpouštědla. Dbejte, abyste neaspirovali pelet.
7. Poklepáním na stěnu nebo dno zkumavky prstem pelet resuspendujte.
8. Spusťte časovač na 20 minut.
9. Po kapkách přidejte 3–4 ml předehřátého (35–37 °C) hypotonického roztoku (0,075 M chloridu draselného).
10. Zkumavku těsně zazátkujte a poklepáním prstem na stěnu nebo dno jemně promíchejte.
11. Po kapkách přidejte 5–6 ml předehřátého (35–37 °C) hypotonického roztoku. Zkumavku těsně zazátkujte a převraťte.
12. Opakujte kroky 8–10 u každé zkumavky.
13. Nechte zkumavky odstát při 35–37 °C ve vodní lázni. V polovině 20 minut měřených časovačem zkumavky jednou převraťte.
14. Až časovač odměří 20 minut, přidejte do každé zkumavky 1 ml čerstvého Carnoyova fixačního roztoku (3 : 1). Každou zkumavku těsně zazátkujte a převraťte. (Toto je předfixační krok.)
15. Odstřeďujte zkumavky po dobu 8 minut při 1 000 ot./min.
16. Z každé zkumavky aspirujte supernatant; ponechte přitom přibližně 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 nutné odstranit ručně Pasteurovou pipetou (nikoli podtlakovou aspirací), abyste zabránili nasátí celého buněčného peletu do odpadní nádoby.

17. Resuspendujte buněčný pelet podle popisu v kroku 7.
18. Po kapkách přidejte 3–4 ml čerstvého Carnoyova fixačního roztoku (3 : 1).
19. Doplňte zbývajícím fixačním roztokem do 7 ml.
20. Opakujte kroky 16–18 u každé zkumavky.
21. Nechte 10 minut odstát při pokojové teplotě. (Toto je první fixační krok.)
22. Odstřeďujte zkumavky po dobu 8 minut při 1 000 ot./min.
23. Aspirujte supernatant; ponechte přibližně 1 ml nad buněčným peletem. Resuspendujte buněčný pelet.
24. Doplňte fixačním roztokem do 7 ml. Odstřeďujte zkumavky po dobu 8 minut při 1 000 ot./min. (Druhý fixační krok.)
25. Opakujte kroky 23–24. (Třetí fixační krok.)
26. 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.

KLINICKÉ APLIKACE

Modální počet lidských chromozomů je 46. Lidské chromozomy jsou klasifikovány podle délky a umístění centromery (denverská klasifikace). Strukturní aberace chromozomů jsou spojeny s řadou vrozených poruch, například s Downovým syndromem (obvykle s jedním malým autozomem navíc) a se syndromy spojenými s pohlavní nevyhraněností (Turnerův a Klinefelterův syndrom a jiné, kde se objevují abnormální pohlavní chromozomy). Získanou chromozomální abnormalitu lze zjistit u určitého procenta leukocytů u chronické myelocytické leukemie (filadelfský chromozom) a postup léčby lze vyhodnocovat sledováním tohoto markeru. Když se radioterapie blíží limitu tolerance, v krvi dochází ke značnému nárůstu množství buněk s nestandardní strukturou chromozomů a jejich výskyt se používá jako vodítko ke stanovení vhodných dávek.

UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

CHANG Medium MF je třeba do použití uchovávat při teplotě nižší než −10 °C. Pokud je skladováno zmrazené, CHANG Medium MF je stabilní do data exspirace uvedeného na štítku lahve. Po rozmrazení lze všechen nespotřebovaný výrobek rozdělit na díly používané při zpracování a znovu zmrazit (maximálně dvakrát) 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 Medium MF obsahuje FBS 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 médií je vždy třeba používat aseptické techniky. Nepoužívejte žádné médium, které nemá červenou barvu.

DANSK

INDIKATIONER FOR ANVENDELSE

CHANG Medium MF er et brugsklart medium uden mitogener til anvendelse ved dyrkning af perifert blod og andre prøver til cytogenetisk analyse.

BESKRIVELSE AF PRODUKTET

CHANG Medium MF består af RPMI, der indeholder 20 % FBS, 2 mM glutamin, 20 mM HEPES-buffer og antibiotikummet gentamicinsulfat. Det kan kræve tilsættelse af mitogene stoffer, som f.eks. phytohemagglutinin (PHA), for at optimere væksten af celler i perifert blod og andre celler. Den påkrævede koncentration af PHA (eller andre mitogene stoffer) skal fastlægges af det individuelle laboratorium.

KOMPONENTER

Aminosyre

Arginin
Asparagin
Asparaginsyre
Cystin
Glutaminsyre
Glutamin
Glycin
Histidin
Isoleucin
Leucin
Lysin
Methionin
Phenylalanin
Prolin
Serin
Threonin
Tryptofan
Tyrosin
Valin

Vand

Af kvalitet til injektionsvæske

Proteiner, hormoner og vækstfaktorer

Føtalt bovint serum (FBS)

pH-indikator

Rød fenol

Andet

Biotin
Hydroxyprolin
Glutathion

Buffere

Natriumbikarbonat
HEPES

Energisubstrater

Glukose
Inositol

Salte og ioner

Natriumklorid
Kolinklorid
Kalciumnitrat
Kaliumklorid
Magnesiumsulfat
Natriumfosfat

Antibiotikum

Gentamicinsulfat

Vitaminer og sporelementer

Folinsyre
Nicotinamid
Riboflavin
Thiamin
Pantothensyre
Cobalamin
Pyridoxin
Paraaminobenzoesyre

KVALITETSSIKRING

STERILITET

Serum, der er anvendt i produktionen af CHANG Medium MF, er testet for viral kontamination ifølge CFR Title 9 Part 113.53. Det er også screenet for mykoplasmakontaminering. CHANG Medium MF er steriliseret ved filtrering gennem et filter på 0,1 mikron. Prøver af CHANG Medium MF testes for potentiel bakteriologisk kontaminering ifølge protokollen for sterilitetstestning som beskrevet i den aktuelle USP-sterilitetstest <71>.

Flere faktorer, herunder prøvekilde, 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 rutineanvendelse.

Hvert parti CHANG Medium MF evalueres med perifert blod for mitotisk indeks, kromosomlængde og -kvalitet sammenlignet med et kontrolmedium. Resultaterne rapporteres på et partispecifikt analysecertifikat.

NØDVENDIGE MATERIALER OG UDSTYR, DER IKKE MEDFØLGER

1. Phytohemagglutinin- (PHA) opløsning (9 mg/ml), steril
2. Fenolfrit heparin
3. Colcemid 25 µg/ml opløsning
4. Kaliumkloridopløsning, 75 mM
5. Eddikesprit, 1 del iseddikesyre: 3 dele methanol (analytisk reagenskvalitet)
6. Giemsa eller 2 % eddikesyre-orcein
7. Kromsyre
8. Monteringsmedium
9. Objektglas og dækglas
10. Plasticcentrifugerør
11. CO_2-inkubator
12. Bordcentrifuge
13. Vortexmixer
14. Lysmikroskop

PRØVETAGNING OG KLARGØRING

Om fuldblodskulturer kan anvendes med held til cytogenetisk analyse afhænger af niveauet af lymfocytter med normal funktion på prøvetagningstidspunktet. Da dette niveau kan blive påvirket af infektion og lægemidler, må patienter til cytogenetiske undersøgelser så vidt muligt ikke have indtaget lægemidler i 7 dage inden prøvetagning af blod til analyse. På samme måde kan det mitotiske indeks være kraftigt reduceret under de anergiske faser af visse sygdomme (f.eks. Hodgkins sygdom, sarkoidose m.fl.) samt i mindre grad hos normale kvinder senere i graviditeten. Der må ikke tilsættes konserveringsmiddel til blodprøver til dyrkning af lymfocytter. Aseptisk teknik er yderst vigtig.

Blodprøver skal så vidt muligt analyseres uden forsinkelse. Hvis det er absolut nødvendigt, kan de opbevares ved 2-8 °C i højst 48 timer.

KLARGØRING

Optø 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.

Bemærk: Der dannes ofte kalciumkarbonatkrystaller i CHANG Medium MF. Tilstedeværelsen af disse krystaller lader ikke til at forårsage nogen skadelig effekt på produktets ydeevne.

BRUGSANVISNING

Fuldblod eller separerede leukocytter er blevet anvendt til cytogenetiske undersøgelser, men fuldblod er det mest enkle og mest anvendte til rutineundersøgelser. Som ved alle celledyrkningsprocedurer er optimale resultater afhængige af etablering af hensigtsmæssige dyrkningsforhold. Da det relative indhold af aktivt PHA kan variere lidt mellem forskellige batcher, kan det være nyttigt at analysere to PHA-koncentrationer.

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.

I. Prøveforberedelse:

Tag 5-10 ml friskt blod i natriumheparin til voksne og 2-3 ml til pædiatriske patienter.

- Fuldblod skal transporteres ved stuetemperatur og blandes ved at vende røret op og ned.
- Lymfocytter fra fuldblod kan stimuleres med phytohemagglutinin (PHA) og kan dyrkes ved hjælp af en synkroniseringsteknik.

II. Dyrkning af fuldblod:

Marker alle dyrkningsbeholderne med patientnavn, prøvenummer og kulturtype.

1. Bring CHANG Medium MF til stuetemperatur, inden prøven indpodes.
2. Rekonstituer PHA ved at tilsætte 5 ml sterilt, destilleret vand med en steril sprøjte.
3. Klargør de påkrævede 5 ml CHANG Medium MF, der er nødvendige til hver dyrkningsbeholder ved anvendelse af aseptisk teknik.
4. Tilsæt 0,1 ml rekonstitueret PHA pr. dyrkningsbeholder.
5. Indpod 0,3 ml prøve pr. kultur. Hvis patienten er et spædbarn (< 1 måned), indpodes med 0,2 ml prøve.
6. Hvert enkelt laboratorium bestemmer antallet af kulturer, der skal opsættes, afhængigt af patientens kliniske indikation og alder. Der skal indledes en yderligere 48 timers dyrkning på prøver fra nyfødte (< 1 måned) uden synkronisering.
7. Inkuber kulturerne ved 35-39 °C i en atmosfære med 5-8 % CO_2, indtil de er klar til at blive høstet.
8. Til synkronisering: Efter 48 timers inkubation tilsættes 50 µl arbejdsopløsning af methotrexat til hver 5 ml kultur, der skal høstes efter 72 timer. Tilsæt 100 µl arbejdsopløsning af thymidin til hver 5 ml kultur 18-19 timer efter tilsætning af methotrexat (5-6 timer før høst).

III. Høst af kulturerne:

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

16. 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.
17. Resuspender cellepelleten, som beskrevet i trin 7.
18. 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 16-18 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 fikseringsopløsning op til 7 ml total volumen i hvert rør. Centrifuger rørene i 8 minutter ved 1.000 o/min. (Andet fikseringstrin).
25. Gentag trin 23-24. (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.

KLINISKE APPLIKATIONER

Det modale humane kromosomnummer er 46. Humane kromosomer er klassificeret i forhold til deres længde og centromerens position (Denver-klassifikation). Afvigende kromosomsammensætning er blevet associeret med et antal medfødte sygdomme som f.eks. Down syndrom (typisk med et ekstra lille autosom) og syndromer associeret med ubestemmelig seksualitet (Turners syndrom, Klinefelters syndrom og andre syndromer, hvor kønskromosomerne afviger). En erhvervet kromosomafvigelse kan påvises i en proportion af leukocytterne ved kronisk myeloid leukæmi (Philadelphia-kromosomet), og behandlingens forløb kan vurderes ifølge denne markør. Når man nærmer sig tolerancegrænsen under strålebehandling, er der en markant øgning i proportionen af celler med bizar kromosomsammensætning, og disse cellers fremkomst er blevet anvendt som retningslinje for dosering.

OPBEVARING OG STABILITET

Opbevar CHANG Medium MF frossent under -10 °C indtil anvendelse. CHANG Medium MF er stabilt indtil udløbsdatoen på flaskeetiketten ved opbevaring i frossen tilstand. Efter optøning kan evt. ubrugt produkt afmåles i brugelige mængder og genfryses (maksimalt to timer) 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 Medium MF indeholder FBS 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 medier. Et medium, der ikke er rødt, må ikke anvendes.

SUOMI

KÄYTTÖAIHE

CHANG Medium MF on mitogeeneja sisältämätön käyttövalmis kasvatusliuos. Se on tarkoitettu perifeerisen veren ja muiden näytteiden viljelemiseen sytogeneettistä analyysiä varten.

VÄLINEEN KUVAUS

CHANG Medium MF sisältää RPMI-elatusainetta, joka sisältää 20 % naudan sikiön seerumia, 2 mM glutamiinia, 20 mM HEPES-puskuria ja gentamysiinisulfaatti-antibioottia. Liuokseen on ehkä lisättävä mitogeenisia aineita kuten fytohemagglutiinia (PHA) perifeerisen veren solujen ja muiden solujen kasvun optimoimiseksi. Yksittäisen laboratorion on määritettävä PHA:n (tai muiden mitogeenien) tarvittava pitoisuus.

AINESOSAT

Aminohappo

arginiini
asparagiini
asparagiinihappo
kystiini
glutamiinihappo
glutamiini
glysiini
histidiini
isoleusiini
leusiini
lysiini
metioniini
fenyylialaniini
proliini
seriini
treoniini
tryptofaani
tyrosiini
valiini

Vesi

injektionesteisiin tarkoitetun veden laatuinen

Proteiinit, hormonit ja kasvutekijät

naudan sikiön seerumi (FBS)

pH-indikaattori

fenolipuna

Muut

biotiini
hydroksiproliini
glutationi

Puskurit

natriumbikarbonaatti
HEPES

Energiasubstraatit

glukoosi
inositoli

Suolat ja ionit

natriumkloridi
koliinikloridi
kalsiumnitraatti
kaliumkloridi
magnesiumsulfaatti
natriumfosfaatti

Antibiootti

gentamysiinisulfaatti

Vitamiinit ja hivenaineet

foolihappo
nikotiiniamidi
riboflaviini
tiamiini
pantoteenihappo
kobalamiini
pyridoksiini
aminobentsoiinihappo

LAADUNVARMENNUS

STERIILIYS

CHANG Medium MF -tuotteen valmistuksessa käytettävä seerumi on testattu viruskontaminaation varalta CFR-säännöksen osan 9 pykälän 113.53 mukaisesti. Se on seulottu myös mykoplasmakontaminaation varalta. CHANG Medium MF on steriloitu suodattamalla 0,1 mikronin suodattimen läpi. CHANG Medium MF -tuotteen näytteet testataan mahdollisen bakteerikontaminaation varalta noudattaen nykyisessä USP-steriiliystestissä <71> kuvattua steriilitestausmenettelyä.

Saatuun tulokseen voivat vaikuttaa useat tekijät, kuten näytteen lähde, viljelyolosuhteet ja reagenssien valinta. Käyttäjiä neuvotaan testaamaan jokainen uusi reagenssierä rinnakkain tunnetun, sopivan aktiivisuuden omaavan materiaalin kanssa ennen kuin erä otetaan rutiininomaiseen käyttöön.

Jokaisen CHANG Medium MF -erän mitoosi-indeksi, kromosomipituus ja -laatu arvioidaan perifeerisestä verestä kontrolliliuokseen verrattuna. Tulokset ilmoitetaan eräkohtaisessa analyysisertifikaatissa.

TARVITTAVAT MATERIAALIT JA LAITTEISTOT, JOITA EI TOIMITETA MUKANA

1. Fytohemagglutiinin (PHA) liuos (9 mg/ml), steriili
2. Fenolia sisältämätön hepariini
3. Colcemid-liuos, 25 µg/ml
4. Kaliumkloridiliuos, 75 mM
5. Etikkahappoalkoholi, 1 osa jääetikkaa: 3 osaa metanolia (analyyttisen laadun reagenssi)
6. Giemsa-väri tai 2-prosenttinen etikkahappo-orseiini
7. Kromihappo
8. Istutusaine
9. Näytelaseja ja peitinlaseja
10. Muovisia sentrifugiputkia
11. CO_2-lämpökaappi
12. Pöytäsentrifugi
13. Vortex-sekoitin
14. Valomikroskooppi

NÄYTTEEN KERÄÄMINEN JA KÄSITTELY

Sytogeneettistä analyysiä varten tehtyjen kokoveriviljelmien onnistumiseen vaikuttaa normaalisti toimivien lymfosyyttien määrä näytteenottohetkellä. Koska infektio ja lääkeaineet vaikuttavat tähän määrään, aina kun mahdollista, sytogeneettisten tutkimusten potilaiden ei tule ottaa lääkkeitä 7 päivään ennen verenottoa testejä varten. Mitoosi-indeksi voi samoin pienentyä huomattavasti tiettyjen sairauksien anergiavaiheissa (esim. Hodgkinin tauti, sarkoidoosi jne.) sekä vähäisemmässä määrin normaalihenkilöillä raskauden viimeisten vaiheiden aikana. Lymfosyyttiviljelmiin tarkoitettuihin verinäytteisiin ei saa lisätä säilöntäainetta. Aseptiset menetelmät ovat ratkaisevan tärkeitä.

Verinäytteet on testattava ilman viivytystä aina kuin mahdollista. Jos on ehdottoman välttämätöntä, niitä voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa, ei pitempään kuin 48 tuntia.

KÄYTÖN VALMISTELU

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.

Huomautus: CHANG Medium MF -liuokseen muodostuu usein kalsiumkarbonaattikiteitä. Näiden kiteiden esiintymisen ei ole osoitettu heikentävän tuotteen toimintakykyä millään tavoin.

KÄYTTÖOHJEET

Sytogeneettisiin tutkimuksiin on käytetty sekä kokoverinäytteitä tai eristettyjä leukosyyttejä, mutta ensin mainittu on yksinkertaisin ja rutiinitutkimuksissa eniten käytetty. Kuten missä tahansa soluviljelymenetelmässä, optimaaliset tulokset riippuvat sopivien viljelyolosuhteiden vakiinnuttamisesta. Koska aktiivisen PHA:n suhteellinen pitoisuus voi hieman vaihdella eri erien välillä, voi olla hyödyllistä testata kahta PHA-pitoisuutta.

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

I. Näytteen valmistelu:

Ota tuore verinäyte natriumhepariiniin, 5–10 ml aikuisilta ja 2–3 ml lapsilta.

- Kokoverinäyte on kuljetettava huoneenlämpöisenä. Se sekoitetaan kääntämällä.
- Kokoveren lymfosyytit voidaan stimuloida fytohemagglutiinilla (PHA), ja niitä voidaan viljellä synkronointitekniikalla.

II. Kokoveriviljelmä:

Merkitse kaikkiin viljelyastioihin potilaan nimi, näytenumero ja viljelytyyppi.

1. Anna CHANG Marrow MF -liuoksen tasapainottua ympäristön lämpötilaan ennen näytteen siirrostamista.
2. Liuota PHA nesteeseen lisäämällä 5 ml steriiliä tislattua vettä steriilillä ruiskulla.
3. Valmistele tarvittava 5 ml:n määrä CHANG Medium MF -liuosta kutakin viljelmäastiaa varten. Käytä aseptista tekniikkaa.
4. Lisää 0,1 ml käyttövalmiiksi saatettua PHA:ta viljelmäastiaa kohti.
5. Siirrosta 0,3 ml näytettä viljelmää kohti. Jos potilas on vauvaikäinen (< 1 kk:n ikäinen), siirrosta 0,2 ml näytettä.
6. Jokaisen yksittäisen laboratorion on määritettävä aloitettavien viljelmien määrä potilaan kliinisen indikaation ja iän mukaisesti. Vastasyntyneiden (< 1 kk:n ikäinen) näytteistä on käynnistettävä lisäksi 48 tunnin viljelmä ilman synkronointia.
7. Inkuboi viljelmiä 35–39 °C:ssa 5–8-prosenttisessa CO_2-ilmakehässä, kunnes ne ovat valmiita kerättäviksi.
8. Synkronointia varten: Lisää 48 tunnin inkubaation jälkeen kuhunkin 72 tunnin kohdalla kerättävään viljelmään metotreksaatin käyttöliuosta 50 µl / 5 ml. Lisää 18–19 tuntia metotreksaatin lisäämisen jälkeen (5–6 tuntia ennen keräämistä) kuhunkin viljelmään tymidiinin käyttöliuosta 100 µl / 5 ml.

III. Viljelmien kerääminen:

1. Ota kerättäväksi valmis viljelmä lämpökaapista ja pyöritä pulloa hellävaroen solujen suspendoimiseksi.
2. Siirrä kunkin pullon sisältö 15 ml:n sentrifugiputkeen.
3. Lisää 40 µl Colcemid-kantaliuosta (10 µg/ml) jokaiseen viljelyputkeen. Sulje putket tiukasti korkilla ja sekoita varovasti kääntelemällä.
4. Inkuboi putkia 35–39 °C:ssa 45 minuutin ajan.
5. Sentrifugoi putkia inkuboinnin jälkeen 8 minuuttia nopeudella 1 000 rpm.
6. Aspiroi varovasti supernatantti kustakin putkesta alipaineaspiraattorilla, jossa on liuotinlukko. Varo, ettet aspiroi pellettiä.
7. Suspendoi pelletti uudelleen naputtelemalla kunkin putken pohjaa tai kylkeä sormella.
8. Käynnistä 20 minuutin ajastin.
9. Lisää tipoittain 3–4 ml esilämmitettyä (35–37 °C) hypotonista liuosta (0,075 M kaliumkloridi).
10. Sulje korkki tiiviisti ja sekoita napsuttelemalla hellävaroen putken pohjaa tai kylkeä sormella.
11. Lisää tipoittain 5–6 ml esilämmitettyä (35–37 °C) hypotonista liuosta. Sulje korkki tiiviisti ja käännä putki.
12. Toista vaiheet 8–10 kullekin putkelle.
13. Käytä vesihaudetta ja anna putkien seistä 35–37 °C:ssa. Käännä putket kerran 20 minuutin ajastimen keskikohdalla.
14. Lisää 1 ml tuoretta Carnoyn 3:1-fiksatiivia kuhunkin putkeen 20 minuutin ajastuksen päättyessä. Sulje tiiviisti korkilla ja käännä jokainen putki. (Tämä on esifiksatiivivaihe.)
15. Sentrifugoi putkia 8 minuuttia nopeudella 1 000 rpm.
16. Aspiroi supernatantti jokaisesta putkesta. Jätä noin 1 ml nestettä solupelletin yläpuolelle. Varo, ettet aspiroi pellettiä. Varo säikeistä materiaalia, joka voi ulottua solupelletistä ylös supernatanttiin sentrifugoinnin jälkeen. Supernatantin viimeiset muutamat millilitrat on ehkä poistettava käsin pasteurpipetillä (ei imuaspiraatiolla), jotta koko solupelletin imeminen jäteastiaan vältetään.

17. Suspendoi solupelletti uudelleen vaiheessa 7 kuvatulla tavalla.
18. Lisää tipoittain 3–4 ml tuoretta Carnoyn 3:1-fiksatiivia.
19. Lisää loput fiksatiivista niin, että kokonaismäärä on enintään 7 ml.
20. Toista vaiheet 16–18 kullekin putkelle.
21. Anna seistä 10 minuuttia huoneenlämpötilassa. (Tämä on ensimmäinen fiksatiivivaihe.)
22. Sentrifugoi putkia 8 minuuttia nopeudella 1 000 rpm.
23. Aspiroi supernatantti jättäen noin 1 ml nestettä pelletin yläpuolelle. Suspendoi solupelletti uudelleen.
24. Lisää fiksatiivia enintään 7 ml. Sentrifugoi putkia 8 minuuttia nopeudella 1 000 rpm. (Toinen fiksatiivivaihe.)
25. Toista vaiheet 23–24. (Kolmas fiksatiivivaihe.)
26. Fiksattuja solupellettejä voidaan tässä vaiheessa käyttää heti näytelasin valmistamiseen laboratorion vakiomenettelyllä tai säilyttää jääkaapissa (2–8 °C) tai pakastimessa myöhempää käyttöä varten.

KLIINISET KÄYTÖT

Ihmisen tavallinen kromosomiluku on 46. Ihmiskromosomit on luokiteltu pituutensa ja sentromeerin sijainnin mukaan (Denverin luokitus). Poikkeamat kromosomirakenteessa on liitetty erilaisiin synnynnäisiin sairauksiin, kuten Downin oireyhtymään (tyypillisesti pieni lisäautosomi) ja oireyhtymiin, jotka liittyvät määrittämättömään sukupuoleen (Turnerin oireyhtymä, Klinefelterin oireyhtymä ja muut, joissa sukupuolikromosomit ovat poikkeavia). Hankinnainen kromosomipoikkeavuus voidaan havaita osassa leukosyyttejä kroonisessa myelosyyttisessä leukemiassa (Philadelphia-kromosomi), ja hoidon edistymistä voidaan arvioida tätä merkkiainetta seuraamalla. Kun sädehoidossa lähestytään sietorajaa, poikkeavia kromosomirakenteita sisältävien solujen osuus suurenee merkittävästi, ja näiden solujen ulkonäköä on käytetty apuna annoksen määrittämisessä.

SÄILYTTÄMINEN JA STABIILIUS

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

VAROTOIMET JA VAROITUKSET

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

CHANG Medium MF sisältää naudan sikiön seerumia, ja sitä on käsiteltävä 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

„CHANG Medium MF" ir mitogēnu nesaturoša, izmantošanai gatava barotne, kas paredzēta perifēro asiņu un citu paraugu kultivēšanai, lai veiktu to citoģenētiskās analīzes.

IERĪCES APRAKSTS

„CHANG Medium MF" sastāvā ir RPMI, kas satur 20% FBS, 2 mM glutamīna, 20 mM HEPES buferšķīduma un antibiotikas gentamicīna sulfātu. Lai optimizētu perifēro asiņu un citu šūnu augšanu, barotnei, iespējams, jāpievieno mitogēni līdzekļi, piemēram, fitohemaglutinīns (*PHA*). Nepieciešamā fitohemaglutinīna (*PHA*) koncentrācija jānosaka konkrētajā laboratorijā.

SASTĀVDAĻAS

Aminoskābe

Arginīns
Asparagīns
Asparagīnskābe
Cistīns
Glutamīnskābe
Glutamīns
Glicīns
Histidīns
Izoleicīns
Leicīns
Lizīns
Metionīns
Fenilalanīns
Prolīns
Serīns
Treonīns
Triptofāns
Tirozīns
Valīns

Ūdens

Injekciju ūdens (*WFI*) kvalitāte

Proteīni, hormoni un augšanas faktori

Liellopu embriju serums (*fetal bovine serum – FBS*)

pH indikators

Fenolsarkanais

Citas

Biotīns
Hidroksiprolīns
Glutations

Buferi

Nātrija bikarbonāts
HEPES

Enerģijas substrāti

Glikoze
Inozitols

Sāļi un joni

Nātrija hlorīds
Holīna hlorīds
Kalcija nitrāts
Kālija hlorīds
Magnija sulfāts
Nātrija fosfāts

Antibiotikas

Gentamicīna sulfāts

Vitamīni un mikroelementi

Folijskābe
Nikotīnamīds
Riboflavīns
Tiamīns
Pantotēnskābe
Kobalamīns
Piridoksīns
Aminobenzoskābe

KVALITĀTES NODROŠINĀŠANA

STERILITĀTE

„CHANG Medium MF" ražošanā izmantotais serums pārbaudīts, lai noteiktu vīrusālo piesārņojumu, saskaņā ar nosacījumiem Federālo normatīvo aktu kodeksa (*Code of Federal Regulation – CFR*) 9. sadaļas 113.53. nodaļā. Tas pārbaudīts arī, lai noteiktu piesārņojumu ar mikoplazmu. „CHANG Medium MF" ir sterilizēta, filtrējot caur 0,1 mikronu filtru. „CHANG Medium MF" paraugi pārbaudīti, lai noteiktu iespējamo bakteriālo piesārņojumu, atbilstoši sterilitātes testēšanas protokolam, kas aprakstīts pašreizējā ASV Farmakopejas (*USP*) sterilitātes testā <71>.

Iegūto rezultātu var ietekmēt vairāki faktori, tostarp parauga ieguves avots, kultivēšanas apstākļi un reaģentu izvēle. Pirms apstiprināšanas izmantošanai ikdienas praksē lietotājiem ir ieteicams izmēģināt ikvienu jaunu reaģenta partiju, paralēli lietojot salīdzināmo materiālu, kura iedarbība ir zināma un piemērota.

Katra „CHANG Medium MF" partija tiek izvērtēta, izmantojot perifēro asiņu mitotisko indeksu, hromosomu garumu un kvalitāti, salīdzinot ar kontrolbarotni. Rezultāti tiek ziņoti katrai partijai īpašā analīzes sertifikātā.

NEPIECIEŠAMIE, BET NEIETVERTIE MATERIĀLI

1. Fitohemaglutinīna (*PHA*) šķīdums (9 mg/ml), sterils
2. Fenolu nesaturošs heparīns
3. „Colcemid" 25 µg/ml šķīdums
4. Kālija hlorīda šķīdums 75 mM
5. Etiķskābes un spirta maisījums, 1 daļa ūdeni nesaturošas etiķskābes (ledus etiķskābe): 3 daļas metilspirta (analītisko reaģentu klases)
6. Gjemza krāsviela vai 2 % etiķskābes orseīns
7. Hromskābe
8. Saistviela
9. Stikla priekšmetstikliņi un segstikliņi
10. Centrifūgas plastmasas stobriņi
11. CO_2 inkubators
12. Laboratorijas galda centrifūga
13. Virpuļmaisītājs
14. Gaismas mikroskops

PARAUGU ŅEMŠANA UN SAGATAVOŠANA

Pilnasiņu paraugu kultūru citoģenētisko analīžu izdošanos ietekmē normāli funkcionējošo limfocītu daudzums parauga ņemšanas laikā. Tā kā infekcijas vai medikamenti var ietekmēt limfocītu līmeni, personām, kam tiks veikta citoģenētiskā izpēte, ja iespējams, nevajadzētu lietot medikamentus 7 dienas pirms testēšanai paredzēto paraugu ņemšanas. Tāpat noteiktu slimību (piem., Hodžkina slimības, sarkoidozes u. c.) anerģijas fāzes laikā var būt ievērojami samazināts mitotiskais indekss, mazākā mērā – arī veselām sievietēm grūtniecības pēdējos posmos. Limfocītu kultūrām paredzētajiem asins paraugiem jāpievieno konservants. Aseptisku tehniku izmantošana ir ļoti svarīga.

Ja ir iespējams, asins paraugu testēšana jāveic nekavējoties. Ja tas ir absolūti nepieciešams, paraugus var glabāt no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā, bet ne ilgāk par 48 stundām.

SAGATAVOŠANA LIETOŠANAI

Uz nakti atstājiet atkausēties 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.

Piezīme: barotnē „CHANG Medium MF" parasti veidojas kalcija karbonāta kristāli. Nav novērots, ka šie kristāli radītu jebkādu nevēlamu ietekmi uz produkta veiktspēju.

LIETOŠANAS NORĀDĪJUMI

Citoģenētiskajā izpētē tikušas izmantotas gan pilnasinis, gan nošķirti leikocīti, taču pilnasinis ir vienkāršāk lietojamas un tikušas visplašāk lietotas standarta pētījumos. Tāpat kā jebkurā šūnu kultivēšanas procedūrā, optimāli rezultāti ir atkarīgi no adekvātiem kultivēšanas apstākļiem. Tā kā dažādu sēriju aktīvā *PHA* relatīvais saturs var nedaudz atšķirties, var būt noderīga divu *PHA* koncentrāciju testēšana.

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

I. Parauga sagatavošana

5–10 ml svaigu asiņu nātrija heparīnā – pieaugušo paraugi, bet bērnu – 2–3 ml.

- Pilnasinīm jābūt istabas temperatūrā, tās jāsamaisa apvēršot.
- Pilnasiņu limfocītus var stimulēt ar fitohemaglutinīnu (*PHA*) un kultivēt ar sinhronizācijas metodi.

II. Pilnasiņu kultūra

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

1. „CHANG Medium MF" barotnei pirms inokulācijas jābūt apkārtējās vides temperatūrā.
2. Atšķaidiet *PHA*, ar sterilu šļirci pievienojot 5 ml sterila destilēta ūdens.
3. Izmantojot aseptisku metodi, sagatavojiet katram kultivēšanas traukam nepieciešamos 5 ml „CHANG Medium MF".
4. Katram kultivēšanas traukam pievienojiet 0,1 ml atšķaidītā *PHA*.
5. Katrā kultūrā inokulējiet 0,3 ml parauga. Ja pacients ir jaundzimušais (< 1 mēnesi vecs), inokulējiet 0,2 ml parauga.
6. Sagatavojamo kultūru skaits katrai laboratorijai jānosaka atbilstīgi klīniskajai indikācijai un pacienta vecumam. Jaundzimušo (< 1 mēnesi vecu) paraugiem jāsāk papildu 48 stundu kultivēšana bez sinhronizācijas.
7. Kultūras inkubējiet 35–39 °C temperatūrā, 5–8% CO_2 atmosfērā, līdz tās ir gatavas ievākšanai.
8. Sinhronizācijas nolūkā: pēc 48 stundas ilgas kultivēšanas katrai kultūrai, ko ievāks pēc 72 stundām, pievienojiet 50 µl metotreksāta darba šķīduma uz katriem 5 ml kultūras. 18–19 stundas pēc metotreksāta pievienošanas (5–6 stundas pirms ievākšanas) pievienojiet 100 µl timidīna darba šķīduma uz katriem 5 ml kultūras.

III. Kultivētā materiāla ievākšana

1. No inkubatora izņemiet kultūru, kas ir gatava ievākšanai, un kolbu mazliet pagroziet, lai atkārtoti suspendētu šūnas.
2. Pārnesiet katra flakona saturu uz 15 ml centrifūgas stobriņu.
3. Katrā kultūras stobriņā pievienojiet 40 µl kolcemīda standartšķīduma (10 µg/ml). Stobriņus cieši aizvākojiet un saturu samaisiet, stobriņus uzmanīgi apvēršot.
4. Stobriņus 45 minūtes inkubējiet 35–39 °C temperatūrā.
5. Pēc inkubācijas stobriņus 8 minūtes centrifugējiet ar ātrumu 1000 apgr./min.
6. No katra stobriņa, izmantojot vakuuma nosūcēju ar šķīdinātāja uztvērēju, uzmanīgi atsūciet centrifugātu. Jāuzmanās, lai neatsūktu lodīti.
7. Atkārtoti suspendējiet lodīti, ar pirkstu pasitot pa katra stobriņa dibenu vai sāniem.
8. Palaidiet 20 minūšu taimeri.
9. Pilinot pievienojiet 3–4 ml iepriekš sasildīta (35–37 °C) hipotoniska šķīduma (0,075 M kālija hlorīda).
10. Stobriņu cieši aizvākojiet un saturu samaisiet, ar pirkstu pasitot pa stobriņa dibenu vai sāniem.
11. Pilinot pievienojiet 5–6 ml iepriekš sasildīta (35–37 °C) hipotoniska šķīduma. Stobriņu cieši aizvākojiet un apvērsiet.
12. 8.–10. darbību veiciet katram stobriņam.
13. Stobriņus atstājiet ūdens peldē 35–37 °C temperatūrā. Tiklīdz pienācis 20 minūšu taimera puslaiks, stobriņus apvērsiet.
14. 20 minūšu taimera beigās katrā stobriņā pievienojiet 1 ml svaiga „Carnoy" fiksācijas šķīduma proporcijā 3:1. Katru stobriņu cieši aizvākojiet un apvērsiet. (Šī darbība jāveic pirms fiksācijas.)
15. Stobriņus 8 minūtes centrifugējiet ar ātrumu 1000 apgr./min.
16. No katra stobriņa atsūciet 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 centrifugāta ml varbūt vajadzēs atdalīt manuāli ar Pastēra pipeti (nelietojot vakuuma nosūcēju), lai atkritumu konteinerā neiesūktu pilnīgi visu šūnu lodīti.

17. Atkārtoti suspendējiet šūnu lodīti, kā aprakstīts 7. darbībā.
18. Pilinot pievienojiet 3–4 ml „Carnoy” fiksācijas šķīduma proporcijā 3:1.
19. Atlikušo fiksācijas šķīdumu pievienojiet līdz kopējam tilpumam 7 ml.
20. 16.–18. darbību veiciet katram stobriņam.
21. 10 minūtes atstājiet istabas temperatūrā. (Šī ir pirmā fiksācijas darbība.)
22. Stobriņus 8 minūtes centrifugējiet ar ātrumu 1000 apgr./min.
23. Atsūciet centrifugātu, atstājot apmēram 1 ml virs lodītes. Atkārtoti suspendējiet šūnu lodīti.
24. Fiksācijas šķīdumu pievienojiet līdz 7 ml. Stobriņus 8 minūtes centrifugējiet ar ātrumu 1000 apgr./min. (Otrā fiksācijas darbība.)
25. Atkārtojiet 23.–24. darbību. (Trešā fiksācijas darbība.)
26. Nekustīgās šūnu lodītes šajā posmā var izmantot nekavējoties, lai saskaņā ar laboratorijas standarta protokolu sagatavotu priekšmetstikliņus, vai noglabāt ledusskapī (2–8 °C) vai saldētavā izmantošanai vēlāk.

KLĪNISKĀ IZMANTOŠANA

Cilvēka modālo hromosomu skaits ir 46. Cilvēka hromosomas tiek klasificētas atkarībā no to garuma un centromēra novietojuma (pēc Denvera klasifikācijas). Novirzes hromosomu kompleksā tiek saistītas ar virkni iedzimtu traucējumu, piemēram, Dauna sindromu (parasti ar nelielu papildu autosomo hromosomu) un sindromiem, kas tiek saistīti ar nenoteiktu seksualitāti (Tērnera sindroms, Klainfeltera sindroms un citi, kuru gadījumā ir atklātas dzimumhormonu anomālijas). Iegūtas hromosomu novirzes no normas var noteikt, izmantojot leikocītu procentuālo attiecību hroniskas mieloleikēmijas gadījumā („Filadelfijas” hromosomas tests), un, izmantojot šo marķieri, ir iespējams izvērtēt šīs terapijas iedarbīgumu. Ir konstatēts, ka, tuvojoties apstarošanas terapijas panesības robežai, ievērojami palielinās to šūnu procentuālais rādītājs, kurām ir anormāls hromosomu komplekss, un šo šūnu rašanās rādītājs tiek izmantots vadlīnijas devas noteikšanā.

GLABĀŠANA UN STABILITĀTE

Glabājiet „CHANG Medium MF” sasaldētu par –10 °C zemākā temperatūrā, līdz tā ir gatava lietošanai. Glabājot sasaldētā veidā, „CHANG Medium MF” saglabā stabilitāti līdz derīguma termiņam, kas norādīts pudeles etiķetē. Pēc atkausēšanas jebkādus neizlietotā produkta pārpalikumus var dozēt darbā izmantojamās devās un atkārtoti sasaldēt vēlākai izmantošanai (ne vairāk kā divas reizes) vai cieši noslēgtus glabāt 2–8 °C temperatūrā līdz pat 30 dienām. Aizsargājiet no fluorescējošas gaismas.

PIESARDZĪBAS PASĀKUMI UN BRĪDINĀJUMI

Šī ierīce ir paredzēta procedūrās, arī tādās, kurām šī ierīce ir paredzēta, apmācīta personāla lietošanai.

„CHANG Medium MF” satur liellopu embriju serumu (*FBS*), tādēļ ar to jārīkojas, ievērojot vispārējos piesardzības pasākumus darbam laboratorijā. Barotne satur antibiotiku (gentamicīna sulfāts), lai samazinātu mikrobioloģiskā piesārņojuma iespējamību, taču, dozējot barotni, vienmēr jārīkojas aseptiskā veidā. Nelietojiet barotni, ja tā nav sarkanā krāsā.

NEDERLANDS

INDICATIE VOOR GEBRUIK

CHANG Medium MF is een mitogeenvrij, kant-en-klaar medium dat bedoeld is voor gebruik bij de kweek van perifeer bloed en andere monsters voor cytogenetische analyse.

BESCHRIJVING VAN HET HULPMIDDEL

CHANG Medium MF bestaat uit RPMI met 20% FBS, 2 mM glutamine, 20 mM HEPES buffer en het antibioticum gentamicinesulfaat. Het kan nodig zijn om mitogenen toe te voegen, zoals fytohemagglutinine (PHA), om de groei van perifeer bloed en andere cellen te optimaliseren. De vereiste concentratie PHA (of andere mitogenen) dient door het afzonderlijke laboratorium te worden bepaald.

COMPONENTEN

Aminozuren
Arginine
Asparagine
Asparaginezuur
Cystine
Glutaminezuur
Glutamine
Glycine
Histidine
Isoleucine
Leucine
Lysine
Methionine
Fenylalanine
Proline
Serine
Treonine
Tryptofaan
Tyrosine
Valine

Water
Farmaceutisch kwaliteitswater (WFI)

Eiwitten, hormonen en groeifactoren
Foetaal runderserum (FBS)

pH-indicator
Fenolrood

Overige
Biotine
Hydroxyproline
Glutathion

Buffers
Natriumbicarbonaat
HEPES

Energiesubstraten
Glucose
Inositol

Zouten en ionen
Natriumchloride
Cholinechloride
Calciumnitraat
Kaliumchloride
Magnesiumsulfaat
Natriumfosfaat

Antibioticum
Gentamicinesulfaat

Vitaminen en spoorelementen
Foliumzuur
Nicotinamide
Riboflavine
Thiamine
Pantotheenzuur
Cobalamine
Pyridoxine
Aminobenzoëzuur

KWALITEITSBORGING

STERILITEIT

Het serum dat wordt gebruikt bij de productie van CHANG Medium MF is getest op virale besmetting volgens CFR Title 9 Part 113.53. Het is ook gescreend op mycoplasmabesmetting. CHANG Medium MF is gesteriliseerd door middel van filtratie door een 0,1µ-filter. Representatieve monsters van CHANG Medium MF zijn getest op mogelijke bacteriologische besmetting volgens het steriliteitstestprotocol zoals beschreven in de huidige Amerikaanse Farmacopee (USP) steriliteitstest <71>.

Diverse factoren, waaronder de bron van de monsters, 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 mitotische index, chromosoomlengte en kwaliteit van elke partij CHANG Medium MF is beoordeeld met behulp van perifeer bloed en vergeleken met een controlemedium. De resultaten worden vermeld op een partijspecifiek analysecertificaat.

VEREISTE MAAR NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN EN APPARATUUR

1. Fytohemagglutinine (PHA)-oplossing (9 mg/ml), steriel
2. Fenolvrije heparine
3. Colcemide-oplossing, 25 µg/ml
4. Kaliumchlorideoplossing, 75 mM
5. Zuuralcohol, 1 deel ijsazijnzuur: 3 delen methanol (analytische reagenskwaliteit)
6. Giemsa of 2% azijnzuur-orceïne
7. Chroomzuur
8. Insluitmiddel
9. Objectglaasjes en dekglaasjes
10. Kunststof centrifugeerbuisjes
11. CO_2-incubator
12. Tafelcentrifuge
13. Vortexmenger
14. Lichtmicroscoop

VERZAMELEN EN PREPAREREN VAN MONSTERS

Het succes van (vol)bloedkweken voor cytogenetische analyse wordt beïnvloed door het lymfocytengehalte met normale functie tijdens de monstername. Omdat dit gehalte kan worden beïnvloed door infectie en geneesmiddelen, mogen patiënten voor cytogenetisch onderzoek waar mogelijk gedurende 7 dagen vóór het verzamelen van bloed voor onderzoek geen geneesmiddelen innemen. Ook kan de mitotische index in hoge mate zijn verlaagd tijdens de anergische stadia van bepaalde ziektes (bijv. ziekte van Hodgkin, sarcoïdose etc.) en in mindere mate bij normale individuen tijdens de latere stadia van zwangerschap. Er mogen geen conserveringsmiddelen aan bloedmonsters voor een lymfocytenkweek worden toegevoegd. Aseptische technieken zijn essentieel.

Bloedmonsters moeten waar mogelijk onmiddellijk worden getest. Indien absoluut noodzakelijk kunnen zij maximaal 48 uur bij 2 °C tot 8 °C worden bewaard.

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.

NB: Vaak vormen er zich calciumcarbonaatkristallen in CHANG Medium MF. Uit onderzoek is gebleken dat de aanwezigheid van deze kristallen geen nadelige invloed heeft op de prestaties van het product.

GEBRUIKSAANWIJZING

Zowel (vol)bloed als gescheiden leukocyten worden voor cytogenetisch onderzoek gebruikt, maar de eerstgenoemde is de eenvoudigste en wordt het meest toegepast in routinematig onderzoek. Zoals bij elke celkweekprocedure zijn optimale resultaten afhankelijk van het creëren van geschikte kweekomstandigheden. Omdat de relatieve inhoud van actieve PHA per batch enigszins kan verschillen, kan het handig zijn om twee PHA-concentraties te testen.

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.

I. Monsterpreparatie:

Gebruik 5-10 ml vers bloed in natriumheparine voor volwassenen en 2-3 ml voor kinderen.

- Volbloed moet bij kamertemperatuur worden getransporteerd en gemengd door middel van inversie.
- Lymfocyten van volbloed kunnen worden gestimuleerd met fytohemagglutinine (PHA) en kunnen op kweek worden gezet met behulp van een synchronisatiemethode.

II. Volbloedkweek:

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

1. Breng CHANG Medium MF op omgevingstemperatuur voordat u het monster inoculeert.
2. Reconstitueer PHA door met een steriele injectiespuit 5 ml steriel gedistilleerd water toe te voegen.
3. Prepareer op aseptische wijze de vereiste 5 ml CHANG Medium MF die noodzakelijk is voor elke kweekfles.
4. Voeg aan elke kweekfles 0,1 ml gereconstitueerd PHA toe.
5. Inoculeer 0,3 ml monster per kweek. Als de patiënt een pasgeborene is (< 1 maand oud), voert u de inoculatie uit met 0,2 ml monster.
6. Elk laboratorium dient individueel te bepalen hoeveel kweken er moeten worden gemaakt aan de hand van de klinische indicatie en de leeftijd van de patiënt. Voor monsters van pasgeborenen (< 1 maand oud) moet nog eens een kweek van 48 uur worden gestart zonder synchronisatie.
7. Incubeer de kweken bij 35-39 °C en 5-8% CO_2-atmosfeer tot ze kunnen worden geoogst.
8. Voor synchronisatie: Voeg na een incubatie van 48 uur 50 µl werkoplossing van methotrexaat toe aan elke kweek van 5 ml die na 72 uur moet worden geoogst. Voeg 18-19 uur na toevoeging van methotrexaat (5-6 uur vóór het oogsten) 100 µl werkoplossing van thymidine toe aan elke kweek van 5 ml.

III. Oogsten van de kweken:

1. Haal de kweek die kan worden geoogst, uit de incubator en draai de fles voorzichtig rond om de cellen te resuspenderen.
2. Breng de inhoud van elke fles over naar een centrifugeerbuisje van 15 ml.
3. 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.
4. Incubeer de buisjes gedurende 45 minuten bij 35-39 °C.
5. Centrifugeer de buisjes na incubatie gedurende 8 minuten op 1000 omw/min.
6. Aspireer supernatant voorzichtig uit elk buisje met behulp van een vacuümaspirator met opvangreservoir voor oplosmiddelen. Wees voorzichtig dat u de pellet niet aspireert.
7. Resuspendeer de pellet door met een vinger tegen de bodem of de zijkant van elk buisje te tikken.
8. Stel een timer in op 20 minuten.
9. Voeg druppelsgewijs 3-4 ml voorverwarmde (35-37 °C) hypotone oplossing (0,075 M kaliumchloride) toe.
10. 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.
11. Voeg druppelsgewijs 5-6 ml voorverwarmde (35-37 °C) hypotone oplossing toe. Sluit het buisje goed met een dop af en keer het buisje om.
12. Herhaal stap 8 t/m 10 voor elk buisje.
13. 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.

14. Voeg aan het einde van de 20 minuten van de timer 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.)
15. Centrifugeer de buisjes 8 minuten op 1000 omw/min.
16. 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.
17. Resuspendeer de celpellet zoals beschreven in stap 7.
18. Voeg druppelsgewijs 3-4 ml verse 3:1 Carnoy's fixeeroplossing toe.
19. Voeg resterende fixeeroplossing toe tot 7 ml.
20. Herhaal stap 16 t/m 18 voor elk buisje.
21. Laat gedurende 10 minuten staan bij kamertemperatuur. (Dit is de eerste stap van fixatie.)
22. Centrifugeer de buisjes 8 minuten op 1000 omw/min.
23. Aspireer het supernatant en laat ongeveer 1 ml boven de pellet staan. Resuspendeer de celpellet.
24. Voeg fixeeroplossing toe tot 7 ml. Centrifugeer de buisjes 8 minuten op 1000 omw/min. (Dit is de tweede stap van fixatie.)
25. Herhaal stap 23 en 24. (Dit is de derde stap van fixatie.)
26. Nu kunnen de gefixeerde celpellets direct worden gebruikt voor het prepareren van het objectglaasje volgens het standaardprotocol van het laboratorium of in de koelkast (bij 2-8 °C) of in de vriezer worden bewaard voor toekomstig gebruik.

KLINISCHE TOEPASSINGEN

Het modale aantal chromosomen bij de mens is 46. Menselijke chromosomen worden geclassificeerd volgens hun lengte en de positie van het centromeer (Denver-classificatie). Afwijkingen in chromosoomsamenstelling zijn gerelateerd aan een aantal aangeboren stoornissen, zoals het syndroom van Down (meestal met een extra kleine autosoom) en syndromen die te maken hebben met een onduidelijk geslacht (zoals het syndroom van Turner en het syndroom van Klinefelter, waarbij de geslachtschromosomen abnormaal blijken te zijn). Een verworven chromosoomafwijking kan worden vastgesteld in een gedeelte van de leukocyten bij chronische myeloïde leukemie (het 'Philadelphia'- chromosoom) en de voortgang van de behandeling kan worden beoordeeld met behulp van dit kenmerk. Wanneer bij bestralingstherapie de tolerantiegrens wordt bereikt, is er naar verhouding een duidelijk hoger aantal cellen met bizarre chromosoomsamenstelling en het uiterlijk van deze cellen wordt gebruikt als richtlijn voor de dosering.

BEWAREN EN STABILITEIT

Bewaar CHANG Medium MF bevroren bij een temperatuur lager dan -10 °C tot het moment van gebruik. CHANG Medium MF is stabiel tot de houdbaarheidsdatum op het etiket van de fles, mits het product ingevroren wordt bewaard. Na ontdooien kan eventueel ongebruikt product worden opgedeeld in praktische hoeveelheden en (maximaal tweemaal) 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 Medium MF bevat FBS 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 pipetteren van het medium. Gebruik geen medium dat niet rood van kleur is.

POLSKI

PRZEZNACZENIE

Produkt CHANG Medium MF to pożywka wolna od mitogenów, gotowa do użycia, przeznaczona do hodowli próbek krwi obwodowej i innych próbek do analiz cytogenetycznych.

OPIS WYROBU

W skład produktu CHANG Medium MF wchodzi pożywka RPMI z 20-procentowym FBS, glutamina w stężeniu 2 mM, bufor HEPES w stężeniu 20 mM i antybiotyk, siarczan gentamycyny. W celu zoptymalizowania wzrostu komórek krwi obwodowej i innych komórek może być konieczne dodanie czynników mitogennych, takich jak fitohemaglutynina (PHA). Wymagane stężenie PHA (lub innych mitogenów) musi zostać określone przez dane laboratorium.

SKŁADNIKI

Aminokwasy
Arginina
Asparagina
Kwas asparaginowy
Cystyna
Kwas glutaminowy
Glutamina
Glicyna
Histydyna
Izoleucyna
Leucyna
Lizyna
Metionina
Fenyloalanina
Prolina
Seryna
Treonina
Tryptofan
Tyrozyna
Walina

Woda
Woda o jakości WFI

Białka, hormony i czynniki wzrostu
Płodowa surowica bydlęca (FBS)

Wskaźnik pH
Czerwień fenolowa

Inne
Biotyna
Hydroksyprolina
Glutation

Bufory
Wodorowęglan sodu
HEPES

Substraty energetyczne
Glukoza
Inozytol

Sole i jony
Chlorek sodu
Chlorek choliny
Azotan wapnia
Chlorek potasu
Siarczan magnezu
Fosforan sodu

Antybiotyk
Siarczan gentamycyny

Witaminy i pierwiastki śladowe
Kwas foliowy
Nikotynamid
Ryboflawina
Tiamina
Kwas pantotenowy
Kobalamina
Pirydoksyna
Kwas aminobenzoesowy

ZAPEWNIANIE JAKOŚCI

STERYLNOŚĆ

Surowicę używaną do produkcji pożywki CHANG Medium MF przetestowano pod kątem zanieczyszczenia wirusowego zgodnie z Kodeksem Przepisów Federalnych (CFR), tytuł 9, część 113.53. Wykonano również badanie przesiewowe pod kątem zanieczyszczenia mykoplazmą. Pożywkę CHANG Medium MF sterylizowano poprzez filtrację przez filtr o średnicy porów 0,1 mikrona. Próbki pożywki CHANG Medium MF są poddawane testom pod kątem możliwego zanieczyszczenia bakteryjnego zgodnie z protokołem badania sterylności opisanym w najnowszym badaniu sterylności wg Farmakopei Amerykańskiej (USP) <71>.

Na uzyskany wynik może wpłynąć wiele czynników, w tym pochodzenie próbki, warunki hodowli i wybór odczynników. Zalecane jest, aby przed przyjęciem do rutynowego stosowania nowej serii odczynnika użytkownicy przetestowali ją równolegle z materiałem referencyjnym o znanej, odpowiedniej aktywności.

Każda seria pożywki CHANG Medium MF jest poddawana ocenie pod kątem indeksu mitotycznego, długości chromosomów i jakości w porównaniu do pożywki kontrolnej za pomocą krwi obwodowej. Wyniki przedstawiono na swoistym dla danej serii Świadectwie analizy.

MATERIAŁY I WYPOSAŻENIE WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

1. Roztwór fitohemaglutyniny (PHA) (9 mg/ml), sterylny
2. Heparyna wolna od fenolu
3. Roztwór kolcemidu o stężeniu 25 µg/ml
4. Roztwór chlorku potasu, 75 mM
5. Alkohol octowy, 1 część lodowatego kwasu octowego: 3 części metanolu (odczynnik o czystości analitycznej)
6. Barwnik Giemsy lub 2-procentowa orceina w kwasie octowym
7. Kwas chromowy
8. Środek do osadzania
9. Szkiełka podstawowe i nakrywkowe
10. Probówki wirówkowe wykonane z tworzywa sztucznego

11. Inkubator z atmosferą CO_2
12. Wirówka laboratoryjna
13. Wytrząsarka
14. Mikroskop świetlny

POBRANIE PRÓBEK I POSTĘPOWANIE Z NIMI

Sukces hodowli krwi pełnej do analizy cytogenetycznej zależy od poziomu prawidłowo funkcjonujących limfocytów w momencie pobierania próbki. Ze względu na to, że na poziom limfocytów mogą mieć wpływ zakażenia i leki, jeśli jest to możliwe, pacjenci, u których wykonywane są badania cytogenetyczne, nie powinni przyjmować leków 7 dni przed pobraniem krwi do testów. Podobnie indeks mitotyczny może być znacznie zmniejszony podczas faz anergicznych określonych chorób (np. choroby Hodgkina, sarkoidozy itp.) oraz, w mniejszym stopniu, u zdrowych kobiet podczas późniejszych etapów ciąży. Do próbek krwi przeznaczonych do hodowli limfocytów nie należy dodawać środków konserwujących. Konieczne jest stosowanie technik aseptycznych.

Próbki krwi należy niezwłocznie poddawać testom, jeśli jest to możliwe. Jeśli jest to absolutnie konieczne, można je przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C przez maksymalnie 48 godzin.

PRZYGOTOWANIE DO UŻYCIA

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

Uwaga: W pożywce CHANG Medium MF często tworzą się kryształy węglanu wapnia. Nie wykazano, aby obecność tych kryształów wpływała negatywnie na właściwości produktu.

INSTRUKCJA UŻYCIA

Do badań cytogenetycznych wykorzystano krew pełną lub oddzielone leukocyty, ale postępowanie z krwią jest łatwiejsze i jest ona najczęściej stosowana w rutynowych badaniach. Podobnie jak w przypadku każdej procedury hodowli komórkowej, optymalne wyniki są uzależnione od zapewnienia odpowiednich warunków hodowli. Jako że względna ilość aktywnej PHA może nieznacznie różnić się między seriami, przetestowanie dwóch stężeń PHA może być korzystne.
Szczegółowe informacje o wykorzystaniu tych produktów należy zweryfikować w wewnętrznych procedurach oraz protokołach laboratorium, które opracowano i zoptymalizowano pod kątem poszczególnych programów medycznych.

I. Przygotowanie próbki:

Pobrać świeżą krew do heparyny sodowej — 5–10 ml w przypadku osób dorosłych, 2–3 ml w przypadku pacjentów pediatrycznych.

- Próbkę krwi pełnej należy trzymać w temperaturze pokojowej i wymieszać przez odwracanie.
- Limfocyty z krwi pełnej można symulować fitohemaglutyniną (PHA), a ich hodowlę można prowadzić techniką synchronizacji.

II. Hodowla krwi pełnej:

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

1. Przed posiewem próbki doprowadzić pożywkę CHANG Medium MF do temperatury otoczenia.
2. Zrekonstytuować PHA, dodając 5 ml sterylnej wody destylowanej za pomocą sterylnej strzykawki.
3. W sposób aseptyczny przygotować po 5 ml pożywki CHANG Medium MF na każde naczynie hodowlane.
4. Dodać po 0,1 ml zrekonstytuowanej PHA na naczynie hodowlane.
5. Posiać po 0,3 ml próbki na hodowlę. Jeśli pacjentem jest niemowlę (poniżej 1. miesiąca życia), posiać 0,2 ml próbki.
6. Każde laboratorium powinno określić liczbę nastawianych hodowli w zależności od wskazania klinicznego i wieku pacjenta. W przypadku próbek pobranych od noworodków (poniżej 1. miesiąca życia) należy nastawić na dodatkowe 48 godzin wstępną hodowlę bez synchronizacji.
7. Inkubować hodowle w temperaturze 35–39°C w atmosferze 5–8% CO_2, aż hodowle będą gotowe do zbioru.
8. W celu synchronizacji: Po 48 godzinach inkubacji dodać 50 µl roztworu roboczego metotreksatu na każde 5 ml hodowli, która będzie zbierana po 72 godzinach. 18–19 godzin po dodaniu metotreksatu dodać 100 µl roztworu roboczego tymidyny na każde 5 ml hodowli (5–6 godzin przed zbiorem).

III. Zbiór hodowli:

1. Wyjąć hodowle gotowe do zbioru z inkubatora i delikatnie obracać butelki ruchem wirowym, aby zawiesić komórki.
2. Przenieść zawartość każdej butelki do probówki wirówkowej o pojemności 15 ml.
3. Dodać po 40 µl roztworu podstawowego kolcemidu (10 µg/ml) do każdej probówki hodowlanej. Dobrze zamknąć probówki i delikatnie wymieszać, odwracając.
4. Inkubować probówki w temperaturze 35–39°C przez 45 minut.
5. Po inkubacji wirować probówki przez 8 minut przy 1000 rpm.
6. Ostrożnie zaaspirować nadsącz z każdej probówki, używając aspiratora próżniowego z pułapką z rozpuszczalnikiem. Uważać, aby nie zaaspirować osadu.
7. Zawiesić osad, stukając placem w dno lub boczną część próbówki.
8. Uruchomić minutnik ustawiony na 20 minut.
9. Dodać kroplami 3–4 ml wstępnie ogrzanego (35–37°C) roztworu hipotonicznego (chlorek potasu w stężeniu 0,075 M).
10. Dobrze zamknąć probówkę i delikatnie wymieszać jej zawartość, stukając placem w dno lub boczną część próbówki.
11. Dodać kroplami 5–6 ml wstępnie ogrzanego (35–37°C) roztworu hipotonicznego. Dobrze zamknąć próbówkę i odwrócić ją.
12. Powtórzyć kroki 8–10 dla każdej probówki.

13. Włożyć probówki do łaźni wodnej nastawionej na temperaturę 35–37°C. Odwrócić probówki jeden raz po upływie połowy czasu ustawionego na minutniku (20 minut).
14. Dodać po 1 ml świeżo przygotowanego (stosunek 3:1) roztworu utrwalającego Carnoy'a do każdej probówki po upływie 20-minutowego odliczania. Dobrze zamknąć i odwrócić każdą probówkę. (Jest to krok wstępnego utrwalania).
15. Wirować probówki przez 8 minut przy 1000 rpm.
16. Zaaspirować nadsącz z każdej probówki, 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 nadsączu. Aby uniknąć zaaspirowania całego osadu komórkowego do zbiornika na odpady, może być konieczne ręczne usunięcie ostatnich kilku ml nadsączu za pomocą pipety Pasteura (nie korzystając z aspiracji próżniowej).
17. Zawiesić osad komórkowy zgodnie z opisem w kroku 7.
18. Dodać kroplami 3–4 ml świeżo przygotowanego (stosunek 3:1) roztworu utrwalającego Carnoy'a.
19. Uzupełnić pozostałą objętość roztworem utrwalającym — do 7 ml.
20. Powtórzyć kroki 16–18 dla każdej probówki.
21. Pozostawić probówki w temperaturze pokojowej na 10 minut. (Jest to pierwszy krok utrwalania).
22. Wirować probówki przez 8 minut przy 1000 rpm.
23. Zaaspirować nadsącz, pozostawiając około 1 ml roztworu nad osadem. Zawiesić osad komórkowy.
24. Uzupełnić roztworem utrwalającym do objętości 7 ml. Wirować probówki przez 8 minut przy 1000 rpm. (Drugi krok utrwalania).
25. Powtórzyć kroki 23–24. (Trzeci krok utrwalania).
26. 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.

ZASTOSOWANIA KLINICZNE

Modalna liczba ludzkich chromosomów wynosi 46. Ludzkie chromosomy sklasyfikowano na podstawie ich długości i pozycji centromeru (klasyfikacja Denver). Aberracje budowy chromosomu powiązano z licznymi wadami wrodzonymi, jak np. zespół Downa (zwykle z dodatkiem małego autosomu) i zespołami związanymi z nieokreśloną płcią (zespół Turnera, zespół Klinefeltera i inne, w których wykazano anomalie chromosomów płciowych). Nabyte nieprawidłowości chromosomów mogą zostać stwierdzone w proporcji leukocytów w przewlekłej białaczce szpikowej (chromosom „Filadelfia"), a poprzez badanie tego markera można oceniać postęp leczenia. W miarę zbliżania się do granicy tolerancji w radioterapii obserwuje się wyraźny wzrost odsetka komórek o anormalnej strukturze chromosomów, a pojawienie się tych komórek jest wykorzystywane jako wskaźnik dawkowania.

PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ

Pożywkę CHANG Medium MF należy przechowywać zamrożoną w temperaturze poniżej -10°C do czasu użycia. Pożywka CHANG Medium MF zachowuje stabilność do upływu terminu ważności podanego na etykiecie butelki, jeśli jest przechowywana w stanie zamrożonym. Po rozmrożeniu niezużyty produkt można rozdzielić na porcje robocze i zamrozić ponownie (maksymalnie dwa razy) do późniejszego użytku lub szczelnie 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 użytku przez personel wykwalifikowany w dziedzinie procedur obejmujących wskazane zastosowanie, do którego wyrób ten jest przeznaczony.

Pożywka CHANG Medium MF zawiera FBS i należy z nią postępować, przestrzegając standardowych środków ostrożności obowiązujących w laboratorium. Aby zmniejszyć ryzyko zanieczyszczenia bakteryjnego, pożywka zawiera antybiotyk (siarczan gentamycyny). Podczas rozdzielania pożywki należy jednak zawsze stosować techniki aseptyczne. Nie używać pożywki, która nie ma czerwonego koloru.

ROMÂNĂ

INDICAȚIE DE UTILIZARE

CHANG Medium MF este un mediu fără mitogen, gata de utilizat, destinat utilizării pentru cultivarea sângelui periferic și a altor probe în scop de analiză citogenetică.

DESCRIEREA DISPOZITIVULUI

CHANG Medium MF constă în RPMI conținând 20 % FBS, 2 mm glutamină, 20 mm tampon HEPES și antibioticul sulfat de gentamicină. El poate necesita adăugarea de agenți mitogenici, cum ar fi fitohemaglutinina (PHA) pentru a optimiza creșterea celulelor din sângele periferic și a altor celule. Concentrația necesară de PHA (sau alți mitogeni) ar trebui stabilită de laboratorul dumneavoastră.

COMPONENTE

Aminoacid

Arginină
Asparagină
Acid aspartic
Cistină
Acid glutamic
Glutamină
Glicină
Histidină
Izoleucină
Leucină
Lizină
Metionină
Fenilalanină
Prolină
Serină
Treonină
Triptofan
Tirozină
Valină

Apă

Calitate WFI (water for injection) [apă sterilă pentru injecții]

Proteine, hormoni și factori de creștere

Ser fetal bovin (SFB)

Indicator pH

Roșu de fenol

Altul

Biotină
Hidroxiprolină
Glutation

Soluții tampon

Bicarbonat de sodiu
HEPES

Substraturi energetice

Glucoză
Inozitol

Săruri și ioni

Clorură de sodiu
Clorură de colină
Azotat de calciu
Clorură de potasiu
Sulfat de magneziu
Fosfat de sodiu

Antibiotic

Sulfat de gentamicină

Vitamine și oligoelemente

Acid folic
Nicotinamidă
Riboflavină
Tiamină
Acid pantotenic
Cobalamină
Piridoxină
Acid aminobenzoic

ASIGURAREA CALITĂȚII

STERILITATE

Serul utilizat la producerea CHANG Medium MF a fost testat pentru a nu fi contaminat viral, în conformitate cu CFR Titlul 9 Partea 113.53. Acesta a fost de asemenea analizat pentru detectarea contaminării cu mycoplasma. CHANG Medium MF este sterilizat prin filtrare printr-un filtru de 0,1 microni. Probe de CHANG Medium MF sunt testate pentru a nu prezenta o posibilă contaminare bacteriologică urmând protocolul de testare a sterilității descris în testul de sterilitate actual prevăzut de Farmacopeea Americană <71>.

Mai mulți factori, printre care se numără sursa de probe, 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 Medium MF este evaluat folosind sângele periferic pentru indicele mitotic, lungimea cromozomilor și calitatea în comparație cu un mediu de control. Rezultatele sunt raportate într-un certificat de analiză specific pentru fiecare lot.

MATERIALE ȘI APARATURĂ NECESARE, DAR NEFURNIZATE

1. Soluție de fitohemaglutinină (PHA) (9 mg/ml), sterilă
2. Heparină fără fenol
3. Colcemid soluție 25 µg/ml
4. Soluție de clorură de potasiu, 75 mM
5. Acid acetic, 1 parte acid acetic glacial : 3 părți metanol (calitate de reactiv analitic)
6. Giemsa sau acid acetic-orceină 2%
7. Acid cromic
8. Mediu de montare
9. Lame și lamele de sticlă
10. Eprubete de centrifugă din plastic
11. Incubator cu CO_2
12. Centrifugă de masă
13. Agitator vortex
14. Microscop optic

COLECTAREA ȘI MANIPULAREA PROBELOR

Reușita culturilor de sânge integral pentru analiză citogenetică este influențată de nivelul de limfocite cu funcție normală din momentul recoltării. Deoarece acest nivel poate fi afectat de infecții și medicamente, subiecții studiilor citogenetice ar trebui, ori de câte ori este posibil, să nu fi luat medicamente timp de 7 zile înainte de recoltarea sângelui pentru analize. În mod similar, indicele mitotic poate fi mult redus în timpul fazelor anergice ale anumitor boli (de exemplu boala Hodgkin, sarcoidoza, etc.) și, într-o măsură mai mică, la persoanele normale în timpul stadiilor avansate ale gravidității. Nu trebuie adăugați conservanți la probele de sânge pentru culturi de limfocite. Tehnicile aseptice sunt esențiale.

Probele de sânge trebuie testate fără întârziere ori de câte ori este posibil. Dacă este absolut necesar, ele pot fi depozitate la o temperatură între 2 °C și 8 °C nu mai mult de 48 de ore.

PREGĂTIREA PENTRU UTILIZARE

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

Notă: În CHANG Medium MF se formează în mod obișnuit cristale de carbonat de calciu. Nu s-a demonstrat că prezența acestor cristale provoacă vreun efect nedorit asupra performanței produsului.

INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Pentru studii citogenetice au fost utilizate sânge integral sau leucocite separate, dar cel dintâi este cel mai simplu și frecvent de utilizat în studiile de rutină. La fel ca la orice procedură cu culturi de celule, rezultatele optime depind de stabilirea unor condiții de cultură corespunzătoare. Deoarece conținutul relativ de PHA activ poate varia ușor între diferitele loturi, poate fi benefic să se testeze două concentrații de PHA.

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.

I. Pregătirea probei:

Obțineți, pentru adulți, 5 - 10 ml de sânge proaspăt în heparină de sodiu, și 2 - 3 ml pentru copii.

- Sângele integral trebuie transportat la temperatura camerei și amestecat prin inversare.
- Limfocitele din sângele integral pot fi stimulate cu fitohemaglutinină (PHA) și pot fi cultivate cu o tehnică de sincronizare.

II. Cultură de sânge integral:

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

1. Înainte de a inocula specimenul, aduceți CHANG Medium MF la temperatura ambiantă.
2. Reconstituiți PHA prin adăugarea a 5 ml de apă distilată sterilă, folosind o seringă sterilă.
3. Prepararea necesită 5 ml de CHANG Medium MF necesar pentru fiecare vas de cultură, folosind o tehnică aseptică.
4. Adăugați 0,1 ml de PHA reconstituit pentru fiecare vas de cultură.
5. Inoculați 0,3 ml de mostră pentru fiecare cultură. Dacă pacientul este un sugaci (<1 lună), inoculați cu 0,2 ml de mostră.
6. Fiecare laborator individual ar trebui să stabilească numărul de culturi care trebuie realizate în funcție de indicația clinică și de vârsta pacientului. Se va iniția o cultură suplimentară de 48 de ore pe specimenele de la nou-născuți (<1 lună) fără sincronizare.
7. Incubați culturile la o atmosferă de 35 - 39 °C, 5 - 8 % CO_2 până când sunt gata de recoltat.
8. Pentru sincronizare: După 48 de ore de incubare, adăugați 50 µl la 5 ml de soluție de lucru de metotrexat la fiecare cultură care va fi recoltată după 72 de ore. Adăugați 100 µl la 5 ml de soluție de lucru de timidină la fiecare cultură la 18 - 19 ore după adăugarea metotrexatului (la 5 - 6 ore înainte de recoltare).

III. Recoltarea culturilor:

1. Îndepărtați cultura gata de recoltat din incubator și rotiți ușor vasul pentru a resuspenda celulele.
2. Transferați conținutul fiecărui vas într-o eprubetă de centrifugă pentru 15 mL.
3. Adăugați în fiecare eprubetă de cultură 40 µl de soluție stoc de Colcemid (10 µg/ml). Astupați ermetic eprubetele și amestecați ușor prin răsturnare.
4. Incubați eprubetele la 35 - 39 °C timp de 45 de minute.
5. După incubare, centrifugați eprubetele timp de 8 minute la 1.000 rpm.
6. Aspirați cu atenție supernatantul din fiecare eprubetă, folosind un aspirator de vid, cu capcană de dizolvant. Aveți grijă să nu aspirați peleta.
7. Resuspendați peleta bătând cu degetul în partea de jos sau laterală a fiecărei eprubete.
8. Porniți un cronometru de 20 de minute.
9. Adăugați, picătură cu picătură, 3 - 4 ml de soluție hipotonică (0,075 M clorură de potasiu) preîncălzită (35 - 37 °C).
10. Astupați ermetic eprubeta și amestecați ușor bătând cu degetul în partea de jos sau laterală a eprubetei.
11. Adăugați, picătură cu picătură, 5 - 6 ml de soluție hipotonică preîncălzită (35 - 37 °C). Astupați ermetic eprubeta și apoi răsturnați-o.
12. Repetați pașii 8 - 10 pentru fiecare eprubetă.
13. 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.
14. Adăugați 1 ml de fixativ Carnoy proaspăt 3:1 în fiecare eprubetă, la sfârșitul perioadei cronometrate de 20 de minute. Astupați ermetic și apoi răsturnați fiecare eprubetă. (Acesta este un pas prefixativ)
15. Centrifugați eprubetele la 1.000 rpm timp de 8 minute.

16. 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.
17. Resuspendați peleta de celule așa cum se descrie la pasul 7.
18. Adăugați, picătură cu picătură, 3 - 4 ml de fixativ Carnoy proaspăt 3:1.
19. Adăugați restul de fixativ până la 7 ml.
20. Repetați pașii 16 - 18 pentru fiecare eprubetă.
21. Lăsați să stea 10 minute la temperatura camerei. (Acesta este primul pas fixativ).
22. Centrifugați eprubetele la 1.000 rpm timp de 8 minute.
23. Aspirați supernatantul lăsând aproximativ 1 ml deasupra peletei de celule. Resuspendați peleta de celule.
24. Adăugați fixativ până la 7 ml. Centrifugați eprubetele la 1.000 rpm timp de 8 minute. (Al doilea pas fixativ).
25. Repetați pașii 23 - 24. (Al treilea pas fixativ).
26. 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 congelatator pentru utilizare în viitor.

ÎNTREBUINȚĂRI CLINICE

Numărul normal de cromozomi umani este 46. Cromozomii umani au fost clasificați după lungime și poziție centromerului (clasificarea Denver). Aberațiile constituenților cromozomiali au fost asociate cu un număr de tulburări congenitale cum ar fi sindromul Down (în mod tipic cu adăugarea unui autozom mic) și sindroame asociate cu sexualitatea nedefinită (sindromul Turner, sindromul Klinefelter și altele, la care se constată că cromozomii sexului sunt anormali). O anomalie cromozomială dobândită poate fi detectată într-o proporție a leucocitelor în leucemia mielocitică cronică (cromozomul „Philadelphia”), iar evoluția tratamentului poate fi evaluată urmărind acest marker. Pe măsură ce se produce apropierea de limita de toleranță în radioterapie, există o creștere marcată a proporției de celule cu o constituție cromozomială anormală, iar apariția acestor celule a fost utilizată ca ghid pentru dozare.

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

Depozitați CHANG Medium MF congelat, la mai puțin de -10 °C, până când este gata pentru utilizare. CHANG Medium MF este stabil până la data de expirare indicată pe eticheta de pe flacon când este depozitat congelat. După dezghețare, orice produs neutilizat poate fi transferat în părți alicote de lucru și recongelat (de maximum două ori) pentru utilizare ulterioară sau închis ermetic și depozitat la o temperatură de 2 °C - 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 Medium MF conține FBS și ar trebui manipulat aplicând măsurile de precauție general valabile pentru practica de 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 mediilor. Nu folosiți niciun mediu care nu are culoarea roșie.

SVENSKA

INDIKATIONER

CHANG Medium MF är ett medium utan mitogener, färdigt att användas och avsett för användning vid odling av perifert blod och andra provtyper för cytogenetiska analyser.

PRODUKTBESKRIVNING

CHANG Medium MF består av RPMI med 20 % FBS, 2 mM glutamin, 20 mM HEPES-buffert samt gentamicinsulfat. Det kan behöva supplementeras med mitogener, som t.ex. fytohemagglutinin (PHA), för att optimera växten av celler i perifert blod och andra celler. Koncentrationen PHA (eller annan mitogen) som krävs bör fastställas av det enskilda laboratoriet.

KOMPONENTER

Aminosyror

Arginin
Asparagin
Asparaginsyra
Cystin
Glutaminsyra
Glutamin
Glycin
Histidin
Isoleucin
Leucin
Lysin
Metionin
Fenylalanin
Prolin
Serin
Treonin
Tryptofan
Tyrosin
Valin

Vatten

Vatten för injektion (WFI)

Proteiner, hormoner samt tillväxtfaktorer

Fetalt bovint serum (FBS)

pH-indikator

Fenolrött

Övrigt

Biotin
Hydroxiprolin
Glutation

Buffertar

Natriumbikarbonat
HEPES

Energisubstrat

Glukos
Inositol

Salter och joner

Natriumklorid
Kolinklorid
Kalciumnitrat
Kaliumklorid
Magnesiumsulfat
Natriumfosfat

Antibiotikum

Gentamicinsulfat

Vitaminer och spårämnen

Folsyra
Nikotinamid
Riboflavin
Tiamin
Pantotensyra
Kobalamin
Pyridoxin
Aminobensoesyra

KVALITETSSÄKRING

STERILITET

Det serum som används vid framställningen av CHANG Medium MF har testats för viral kontamination enligt CFR titel 9 del 113.53. Det har också screenats för kontamination av mykoplasma. CHANG Medium MF har steriliserats genom filtrering genom ett 0,1 mikronfilter. Prover av CHANG Medium MF testas för eventuell bakteriell kontamination enligt det sterilitetstestningsprotokoll som beskrivs i det aktuella USP-sterilitetstestet (USP Sterility test) <71>.

Ett flertal faktorer, inklusive provets ursprung, odlingsförhållanden och val av reagenser kan påverka det resultat som erhålls. Vi rekommenderar användare att före rutinmässig användning köra varje ny reagensbatch parallellt med referensmaterial av känd, lämplig aktivitet.

Varje lot CHANG Medium MF utvärderas med användning av perifert blod för mitosindex, kromosomlängd och kvalitet jämfört med ett kontrollmedium. Resultaten finns rapporterade på ett lotspecifikt analyscertifikat (Certificate of Analysis).

MATERIAL OCH UTRUSTNING SOM KRÄVS MEN INTE MEDFÖLJER

1. Fytohemagglutininlösning (PHA) (9 mg/ml), steril
2. Fenolfritt heparin
3. Colcemid-lösning, 25 µg/ml
4. Kaliumkloridlösning, 75 mM
5. Ättiksyra-/metanolblandning (”Acetic Alcohol”), 1 del vattenfri ättiksyra: 3 delar metanol (av analytisk kvalitet/reagenskvalitet)
6. Giemsa eller 2 % ättiksyra-orcein
7. Kromsyra
8. Monteringsvätska
9. Objektglas och täckglas
10. Centrifugrör av plast
11. CO_2-inkubator
12. Bänkcentrifug
13. Vortexblandare
14. Ljusmikroskop

PROVTAGNING OCH -HANTERING

Möjligheten till framgångsrik odling av helblod för cytogenetiska analyser påverkas av antalet normalfungerande lymfocyter vid provtagningstillfället. Eftersom detta antal kan påverkas av infektioner och läkemedel bör patienter som ska genomgå cytogenetiska studier så långt möjligt inte ha tagit några läkemedel under sju dagar före blodprovstagningen. Mitosindex kan även vara kraftigt reducerat under de anergiska faserna av vissa sjukdomar (som t.ex. Hodgkins sjukdom, sarkoidos etc.) och, fast i lägre grad, under graviditetens senare del hos normala kvinnor. Konserveringsmedel får inte tillsättas blodprover som ska användas för odling av lymfocyter. Aseptisk teknik är av avgörande betydelse.

Blodproverna ska närhelst så är möjligt testas utan dröjsmål. Om det är absolut nödvändigt kan de förvaras vid 2–8 °C i högst 48 timmar.

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 ekvilibrera till 37 °C för omedelbar användning.

Anm: Kalciumkarbonatkristaller bildas ofta i CHANG Medium MF. Närvaron av dessa kristaller har inte visats inverka negativt på produktens funktion.

BRUKSANVISNING

Helblod eller separerade leukocyter har använts för cytogenetiska studier, men den förra provtypen är den som är enklast och används i störst omfattning för rutinanalyser. Som vid alla cellodlingsförfaranden är optimala resultat beroende av att adekvata odlingsbetingelser etableras. Eftersom det relativa innehållet av aktivt PHA kan variera något mellan olika batcher kan det vara lämpligt att testa två PHA-koncentrationer.

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

I. Provberedning:

Ta färskt blod i natriumheparin, 5–10 ml för vuxna och 2–3 ml för pediatriska patienter.

- Helblod ska transporteras vid rumstemperatur och blandas genom vändning.
- Lymfocyter från helblod kan stimuleras med fytohemagglutinin (PHA) och odlas med en metod som innefattar synkronisering.

II. Odling av helblod:

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

1. Låt CHANG Medium MF uppnå rumstemperatur före utsådd av provet.
2. Rekonstituera PHA genom att tillsätta 5 ml sterilt destillerat vatten med hjälp av en steril spruta.
3. Använd aseptisk teknik till att bereda den nödvändiga mängden på 5 ml CHANG Medium MF för varje odlingskärl.
4. Tillsätt 0,1 ml rekonstituterad PHA per odlingskärl.
5. Inokulera 0,3 ml prov per odling. Om patienten är ett spädbarn (< 1 månad), inokulera med 0,2 ml prov.
6. Varje enskilt laboratorium bör fastställa antalet kulturer som ska förberedas beroende på den kliniska indikationen och patientens ålder. En ytterligare 48-timmars odling ska påbörjas på prover från nyfödda (< 1 månad) utan synkronisering.
7. Inkubera kulturerna vid 35–39 °C, 5–8 % CO_2-atmosfär tills de är klara att skördas.
8. För synkronisering: Efter inkubering i 48 timmar, tillsätt 50 µl arbetslösning metotrexat till varje 5 ml kultur som ska skördas efter 72 timmar. Tillsätt 100 µl arbetslösning tymidin till varje 5 ml kultur 18–19 timmar efter tillsats av metotrexat (5–6 timmar före skörd).

III. Skörda kulturerna:

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

16. 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.
17. Resuspendera cellpelleten enligt beskrivningen i steg 7.
18. Tillsätt droppvis 3–4 ml färsk 3:1 Carnoys fixeringslösning.
19. Tillsätt återstående fixeringslösning till en total rörvolym på upp till 7 ml.
20. Upprepa steg 16–18 för varje rör.
21. Låt stå i 10 minuter vid rumstemperatur. (Detta är det första fixeringslösningssteget).
22. Centrifugera rören i 8 minuter vid 1 000 rpm.
23. Aspirera supernatanten men lämna kvar cirka 1 ml ovanför pelleten. Resuspendera cellpelleten.
24. Tillsätt fixeringslösning till en total rörvolym på upp till 7 ml. Centrifugera rören i 8 minuter vid 1 000 rpm. (Andra fixeringslösningssteget).
25. Upprepa steg 23–24. (Tredje fixeringslösningssteget).
26. 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.

KLINISKA TILLÄMPNINGAR

De humana kromosomerna är 46 till antalet. Humana kromosomer har klassificerats med avseende på deras längd och centromerens position (Denver-klassificeringen). Avvikande uppsättningar kromosomer har associerats med ett antal kongenitala störningar, såsom Downs syndrom (har vanligen en extra liten autosom) och syndrom associerade med könskromosomavvikelser (Turners syndrom, Klinefelters syndrom m.fl. med onormal uppsättning könskromosomer). En förvärvad kromosomavvikelse kan detekteras i en andel av leukocyterna vid kronisk myeloisk leukemi (Philadelphia-kromosomen) och denna markör kan användas till att följa behandlingsvaret. När toleransgränsen börjar närma sig vid strålbehandling ses en markerad ökning av andelen celler med bisarr kromosomuppsättning och uppträdandet av dessa celler har använts som vägledning för doseringen.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

CHANG Medium MF ska förvaras fryst, vid temperatur under –10 °C, tills det ska användas. Vid frysförvaring är CHANG Medium MF hållbart fram till det utgångsdatum som anges på flaskans etikett. Efter upptining kan eventuell oanvänd produkt delas upp i alikvoter och frysas på nytt (högst två gånger) 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 Medium MF innehåller FBS 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 Medium MF on kasutamisvalmis mitogeenivaba sööde perifeerse vere ja muude proovide kultiveerimiseks tsütogeneetilise analüüsi jaoks.

SEADME KIRJELDUS

CHANG Medium MF koosneb RPMI-st, mis sisaldab 20% FBS-i, 2 mM glutamiini, 20 mM HEPES-puhvrit ja gentamütsiinsulfaati (antibiootikum). Perifeerse vere ja teiste rakkude kasvu optimeerimiseks võib olla vajalik lisada mitogeenseid aineid, nagu fütohemaglutiniini (PHA). PHA (või muude mitogeenide) nõutava kontsentratsiooni peab määrama iga labor eraldi.

OSAD

Aminohape
Arginiin
Asparagiin
Asparagiinhape
Tsüstiin
Glutamiinhape
Glutamiin
Glütsiin
Histidiin
Isoleutsiin
Leutsiin
Lüsiin
Metioniin
Fenüülalaniin
Proliin
Seriin
Treoniin
Trüptofaan
Türosiin
Valiin

Vesi
WFI kvaliteet

Valgud, hormoonid ja kasvufaktorid
Veiseloote päritolu seerum (FBS)

pH-indikaator
Fenoolpunane

Muu
Biotiin
Hüdroksüproliin
Glutatioon

Puhvrid
Naatriumvesinikkarbonaat
HEPES

Energia substraadid
Glükoos
Inositool

Soolad ja ioonid
Naatriumkloriid
Koliinkloriid
Kaltsiumnitraat
Kaaliumkloriid
Magneesiumsulfaat
Naatriumfosfaat

Antibiootikum
Gentamitsiinsulfaat

Vitamiinid ja mikroelemendid
Foolhape
Nikotiinamiid
Riboflaviin
Tiamiin
Pantoteenhape
Kobalamiin
Püridoksiin
Aminobensoehape

KVALITEEDI TAGAMINE

STERIILSUS

CHANG Medium MF-i tootmisel kasutatav seerum on testitud viraalse saaste suhtes CFR ptk 9 osa 113.53 kohaselt. Samuti on seda testitud mükoplasma suhtes. CHANG Medium MF on steriliseeritud filtreerimise teel läbi 0,1 µ filtri. Toote CHANG Medium MF proove on võimaliku bakterioloogilise saaste suhtes testitud, järgides steriilsuse katseprotokolli, mida on kirjeldatud kehtivas USP steriilsustestis <71>.

Saavutatavat tulemust võivad mõjutada mitmed tegurid, sh proovi päritolu, kultuurimistingimused ja reaktiivide valik. Kasutajatel soovitatakse igat uut reaktiivipartiid paralleelselt analüüsida teadaolevalt sobiva aktiivsusega võrdlusmaterjaliga, enne kui see võetakse rutiinsesse kasutusse.

Iga CHANG Medium MF-i partii puhul on hinnatud perifeerse vere alusel mitootilist indeksit, kromosoomide pikkust ja kvaliteeti võrreldes kontrollsöötmega. Tulemused on esitatud partiispetsiifilises analüüsisertifikaadis.

VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID JA VAHENDID

1. Fütohemaglutiniini (PHA) lahus (9 mg/ml), steriilne
2. Fenoolivaba hepariin
3. Colcemid 25 µg/ml lahus
4. Kaaliumkloriidi lahus, 75 mM
5. Äädika-alkoholi segu, 1 osa jää-äädikhapet: 3 osa metanooli (analüütilise reaktiivi kvaliteediga)
6. Giemsa või 2% jää-äädikhappe ortseiin
7. Kroomhape
8. Paigaldusaine
9. Klaasslaidid ja katteklaasid
10. Plastist tsentrifuugikatsutid
11. CO_2 inkubaator
12. Lauatsentrifuug
13. Vortex-mikser
14. Valgusmikroskoop

PROOVI VÕTMINE JA KÄITLEMINE

Täisvere kultuuride edukust tsütogeneetilisel analüüsimisel mõjutab tavapäraselt funktsioneerivate lümfotsüütide tase proovi võtmise ajal. Kuna seda taset võivad mõjutada infektsioonid ja ravimid, siis ei tohi võimaluse korra tsütogeneetilistes uuringutes osalejad võtta ravimeid 7 päeva enne vereproovide võtmist. Samuti võib mitootiline indeks märkimisväärselt väheneda mõnede haiguste (nt Hodgkini tõbi, sarkoidoos jne) anergilistes faasides ja vähemal määral ka tervetel inimestel raseduse hilisemates etappides. Vereproovidele ei tohi lümfotsüüdikultuuride korral lisada säilitusainet. Vajalik on aseptiline tehnika.

Vereproove tuleb võimaluse korral testida viivitamatult. Kui on vältimatult vajalik, võib neid säilitada temperatuuril 2–8 °C kuni 48 tundi.

ETTEVALMISTUSED KASUTAMISEKS

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

Märkus. Tootes CHANG Medium MF tekivad sageli kaltsiumkarbonaadi kristallid. Nende kristallide esinemine ei ole põhjustanud kahjulikku toimet toote jõudlusele.

KASUTUSJUHEND

Täisverd või eraldatud leukotsüüte kasutatakse tsütogeneetilistes uuringutes, kuid esimene on ka kõige lihtsam ja kõige levinum rutiinsete uuringute tegemise võimalus. Nagu iga rakukultuuri protseduuri puhul, sõltuvad optimaalsed tulemused piisavate kultuurimistingimuste loomisest. Kuna aktiivse PHA suhteline sisaldus võib erinevates partiides olla veidi erinev, võib olla kasulik testida kaht HA kontsentratsiooni.

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

I. Proovi ettevalmistamine

Võtke täiskasvanute puhul 5–10 ml värsket verd naatriumhepariiniga ja laste puhul 2–3 ml.

- Täisverd tuleb transportida toatemperatuuril ja seda tuleb segada korduvalt ümber pöörates.
- Lümfotsüüte saab täisverest stimuleerida fütohemaglutiniiniga (PHA) ja neid võib kultiveerida sünkroniseerimistehnika abil.

II. Täisvere kultuur

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

1. Enne proovi okuleerimist viige CHANG Medium MF ümbritseva keskkonna temperatuurini.
2. Rekonstitueerige PHA, lisades 5 ml steriilset destilleeritud vett, kasutades selleks steriilset süstalt.
3. Valmistage iga kultuurianuma jaoks ette 5 ml söödet CHANG Medium MF, kasutades selleks aseptilist tehnikat.
4. Lisage 0,1 ml rekonstitueeritud PHA-d kultuurianuma kohta.
5. Okuleerige 0,3 ml proovi kultuuri kohta. Kui patsiendiks on imik (alla 1 kuu vanune), okuleerige 0,2 ml proovi.
6. Iga laboratoorium peab kindlaks määrama kultiveeritavate kultuuride arvu olenevalt patsiendi kliinilisest näidustusest ja vanusest. Vastsündinutelt (alla 1 kuu vanused) võetud proovide puhul tuleb algatada 48-tunnine kultuur, ilma sünkroniseerimiseta.
7. Inkubeerige kultuure temperatuuril 35–39 °C, 5–8% CO_2 atmosfääris, kuni need on valmis kogumiseks.
8. Sünkroniseerimine: pärast 48-tunnist inkubeerimist lisage igale 72 tunni pärast kogutavale 5 ml kultuurile 50 µl töölahust (metotreksaat). Lisage 18–19 tundi pärast metotreksaadi lisamist igale 5 ml kultuurile 100 µl töölahust (tümidiin) (5–6 tundi enne kogumist).

III. Kultuuride kogumine

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

16. 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.
17. Suspendeerige rakupelletit uuesti, nagu on kirjeldatud sammus 7.
18. Lisage tilkhaaval 3–4 ml värsket segu Carnoy's Fixative (metanooli ja äädikhappe segu suhtega 3 : 1).
19. Lisage ülejäänud segu, kuni katsuti täitub tasemeni 7 ml.
20. Korrake samme 16–18 iga katsuti puhul.
21. Laske 10 minutit toatemperatuuril seista. (Tegemist on esimese kinnistava sammuga.)
22. Tsentrifuugige katsuteid 8 minutit 1000 p/min juures.
23. Aspireerige supernatant, jättes rakupelleti peale umbes 1 ml. Suspendeerige rakupelletit uuesti.
24. Lisage segu, kuni katsuti täitub tasemeni 7 ml. Tsentrifuugige katsuteid 8 minutit 1000 p/min juures. (Tegemist on teise kinnistava sammuga.)
25. Korrake samme 23–24. (Tegemist on kolmanda kinnistava sammuga.)
26. Pärast seda saab kinnistatud rakupelleteid kasutada kas kohe slaidi ettevalmistamiseks laboratoorse standardprotokolli kohaselt või säilitada neid edaspidiseks kasutamiseks külmikus (2–8 °C) või sügavkülmas.

KLIINILISED RAKENDUSED

Inimese modaalne kromosoomide arv on 46. Inimese kromosoomid on klassifitseeritud nende pikkuse ja tsentromeeri asendi järgi (Denveri klassifikatsioon). Hälbeid kromosoomses ehituses on seostatud kaasasündinud häiretega, nt Downi sündroomiga (tüüpiliselt üks täiendav väike autosoom) ja määramatu seksuaalsuse sündroomiga (Turneri sündroom, Klinefelteri sündroom jm, kus sookromosoomid normist hälbivad). Omandatud kromosoomihälbe võib tuvastada mitmes leukotsüüdis kroonilise müelotsüütilise leukeemia puhul (Philadelphia kromosoom) ning selle markeri järgi saab hinnata ravi kulgu. Kui kiiritusravis hakkab lähenema tolerantsi piir, suureneb tuntavalt ebatavalise kromosoomse ehitusega rakkude osakaal ning nende rakkude arvu on kasutatud doseerimissuunisena.

SÄILITAMINE JA STABIILSUS

Hoidke CHANG Medium MF-i kuni kasutamiseni külmutatult alla –10 °C. CHANG Medium MF on juhistekohasel säilitamisel stabiilne pudeli etiketile märgitud kuupäevani. Pärast sulatamist võib kasutamata toote jagada tööalikvootidesse ja külmutada hilisemaks kasutamiseks uuesti (kuni kaks korda) või tihedalt korkida ja hoida temperatuuril 2–8 °C kuni 30 päeva. Kaitske fluorestsentsvalguse eest.

ETTEVAATUSABINÕUD JA HOIATUSED

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

CHANG Medium MF sisaldab FBS-i ning seda tuleb käidelda tavapäraste laboratoorsete ettevaatusmeetmetega. Sööde sisaldab antibiootikumi (gentamitsiinsulfaati), et vähendada bakteriaalse saaste võimalust, kuid söötme jaotamisel tuleb alati rakendada aseptilist tehnikat. Ärge kasutage ühtki söödet, mis ei ole punast värvi.

MAGYAR

FELHASZNÁLÁSI JAVALLATOK

A CHANG Medium MF mitogénmentes, használatra kész médium perifériás vér és más minták tenyésztésénél történő használatra citogenetikai elemzés céljából.

TERMÉKISMERTETÉS

A CHANG Medium MF 20% FBS-t, 2 mM glutamint, 20 mM HEPES-puffert és gentamicin-szulfát antibiotikumot tartalmazó RPMI médiumból áll. Mitogén szerek, például fitohemagglutinin (PHA) hozzáadását igényelheti a perifériás vér és más sejtek növekedésének optimalizálásához. A PHA (vagy más mitogének) szükséges koncentrációját az adott laboratórium határozza meg.

ÖSSZETEVŐK

Aminosav

Arginin
Aszparagin
Aszparaginsav
Cisztin
Glutaminsav
Glutamin
Glicin
Hisztidin
Izoleucin
Leucin
Lizin
Metionin
Fenilalanin
Prolin
Szerin
Treonin
Triptofán
Tirozin
Valin

Víz

Injekcióhoz való minőségű víz

Fehérjék, hormonok és növekedési faktorok

Magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum, FBS)

pH-indikátor

Fenolvörös

Egyéb

Biotin
Hidroxiprolin
Glutation

Pufferek

Nátrium-bikarbonát
HEPES

Energiaszubsztrátok

Glükóz
Inozitol

Sók és ionok

Nátrium-klorid
Kolin-klorid
Kalcium-nitrát
Kálium-klorid
Magnézium-szulfát
Nátrium-foszfát

Antibiotikum

Gentamicin-szulfát

Vitaminok és nyomelemek

Folsav
Nikotinamid
Riboflavin
Tiamin
Pantoténsav
Kobalamin
Piridoxin
Aminobenzoesav

MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS

STERILITÁS

A CHANG Medium MF előállításához használt szérum vírusszennyeződését a CFR 9. címének 113.53 része szerint vizsgálták. A médium mikoplazma-szennyeződését is megvizsgálták. A CHANG Medium MF sterilizálása 0,1 mikronos szűrőn át történő szűréssel történt. A CHANG Medium MF mintáit a jelenlegi Amerikai Gyógyszerkönyv sterilitási vizsgálatában <71> leírt sterilitásvizsgálati protokollt követve tesztelik a lehetséges bakteriológiai szennyeződésre.

A kapott eredményt számos tényező befolyásolhatja, beleértve a minta forrását, a tenyésztési körülményeket és a reagensek kiválasztását. Javasoljuk, hogy a felhasználók minden új reagenstételt ismert, megfelelő aktivitású referenciaanyaggal párhuzamosan futtassanak a rutinszerű használat előtt.

A CHANG Medium MF mindegyik tételét perifériás vér alkalmazásával értékelik a mitotikus indexre, a kromoszomális hosszra és a minőségre vonatkozóan, egy kontrollmédiummal összehasonlítva. Az eredményekről jelentés készül egy tételspecifikus analitikai bizonylaton.

SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK ÉS FELSZERELÉS

1. Fitohemagglutinin (PHA) oldat (9 mg/ml), steril
2. Fenolmentes heparin
3. 25 µg/ml-es kolcemid-oldat
4. Kálium-klorid oldat, 75 mM
5. Ecetsav-alkohol, 1 rész jégecet : 3 rész metanol (analitikai reagens minőségű)
6. Giemsa vagy 2%-os orcein-ecetsav
7. Krómsav
8. Fedőfolyadék
9. Üveg tárgylemezek és fedőlemezek
10. Műanyag centrifugacsövek
11. CO_2-inkubátor
12. Asztali centrifuga
13. Vortex keverő
14. Fénymikroszkóp

A MINTÁK GYŰJTÉSE ÉS KEZELÉSE

A teljes vértenyészetek sikerességét a citogenetikai analízisnél befolyásolja a normál funkciójú limfociták szintje a mintavétel időpontjában. Mivel ezt a szintet a fertőzések és a gyógyszerek befolyásolhatják, a citogenetikai vizsgálatok lehetséges alanyainak a vérvételt megelőzően 7 napig nem szabad gyógyszert szedniük. Hasonlóképpen, a mitotikus index nagy mértékben csökkenhet bizonyos betegségek (pl. Hodgkin-kór, szarkoidózis stb.) anergikus fázisaiban, és kisebb mértékben normál egyénekben a terhesség későbbi szakaszában. Limfocitatenyészet esetén nem szabad tartósítószert adni a vérmintákhoz. Az aszeptikus technikák használata elengedhetetlen.

A vérmintákat lehetőség szerint azonnal meg kell vizsgálni. 2 és 8 °C közötti hőmérsékleten legfeljebb 48 órán át tárolhatók, ha ez feltétlenül szükséges.

ELŐKÉSZÍTÉS A FELHASZNÁLÁSRA

Egy éjszakán 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.

Megjegyzés: A CHANG Medium MF médiumban gyakran képződnek kalcium-karbonát kristályok. A kristályok jelenlétéről nem mutatták ki, hogy bármilyen káros hatással lenne a termék teljesítményére.

HASZNÁLATI UTASÍTÁS

A citogenetikai vizsgálatokhoz teljes vért vagy szeparált leukocitákat használnak, azonban az előbbi a legegyszerűbb és legelterjedtebben használt a rutin vizsgálatokban. Mint minden sejttenyésztési eljárásnál, az optimális eredmény a megfelelő tenyésztési körülmények megteremtésétől függ. Mivel az aktív PHA relatív tartalma kissé eltérő lehet a különböző tételek esetén, előnyös lehet két PHA-koncentráció tesztelése.

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.

I. Minta-előkészítés:

Felnőttek esetében 5–10 ml friss vér szükséges, (nátrium-heparinban), gyermekeknél pedig 2–3 ml.

- A teljes vért szobahőmérsékleten kell szállítani, és fel-le fordítva kell összekeverni.
- A teljes vérből a limfociták fitohemagglutinin (PHA) segítségével stimulálhatók, és szinkronizációs technikával tenyészthetők.

II. Teljes vértenyészet:

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

1. A minta inokulációja előtt érje el, hogy a CHANG Medium MF környezeti hőmérsékletű legyen.
2. Oldja fel a PHA-t 5 ml steril desztillált víz steril fecskendővel történő hozzáadásával.
3. Aszeptikus technika alkalmazásával készítse elő a szükséges 5 ml CHANG Medium MF médiumot mindegyik tenyésztőedényhez.
4. Adjon hozzá tenyésztőedényenként 0,1 ml feloldott PHA-t.
5. Inokulálja tenyésztőedényenként 0,3 ml mintával. Újszülötteknél (1 hónapos kor alatt) 0,2 ml mintával kell inokulálni.
6. Minden egyes laboratóriumnak a beteg klinikai indikációjától és életkorától függően kell meghatároznia a létrehozni kívánt tenyészetek számát. Az újszülöttektől (1 hónapos kor alatt) vett mintákon egy további 48 órás tenyészetet kell elindítani szinkronizáció nélkül.
7. Inkubálja a tenyészeteket 35–39 °C-on, 5–8%-os CO_2-atmoszférában, amíg készen nem állnak a begyűjtésre.
8. A szinkronizációhoz: 48 óra inkubálás után adjon hozzá 50 µl/5 ml metotrexát munkaoldatot mindegyik tenyészethez, amelyet 72 óra elteltével kíván összegyűjteni. A metotrexát hozzáadása után 18–19 órával adjon hozzá 100 µl/5 ml timidin munkaoldatot minden tenyészethez (a összegyűjtés előtt 5–6 órával).

III. A tenyészetek összegyűjtése:

1. Az összegyűjtésre készen álló tenyészetet vegye ki az inkubátorból, és a sejtek újbóli felszuszpendálásához óvatosan forgassa meg a flaskát.
2. Tegye át minden egyes flaska tartalmát egy-egy 15 ml-es centrifugacsőbe.
3. 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.
4. Inkubálja a csöveket 35–39 °C-on 45 percig.
5. Az inkubálás után centrifugálja a csöveket 8 percig 1000 rpm-en.
6. Óvatosan szívja le a felülúszót az egyes csövekből vákuumszívással, oldószerfogó használatával. Ügyeljen arra, hogy ne szívja le a pelletet.
7. Az ujjával ütögesse meg az egyes csövek alját vagy oldalát a pellet újbóli felszuszpendálásához.
8. Állítson be 20 perces időzítést.
9. Cseppenként adjon hozzá 3–4 ml előmelegített (35–37 °C) hipotóniás oldatot (0,075 M kálium-klorid).
10. Szorosan zárja le a csövet, és ujjával a cső alját vagy oldalát megütögetve óvatosan keverje össze a tartalmát.
11. Cseppenként adjon hozzá 5–6 ml előmelegített (35–37 °C) hipotóniás oldatot. Szorosan zárja le a csövet, majd fordítsa fel.
12. Ismételje meg a 8–10. lépést mindegyik csővel.
13. Vízfürdő használatával állítsa fel a csöveket 35–37 °C-on. A 20 perces időzítés felénél fordítsa fel egyszer a csöveket.
14. A 20 perces időzítés végén mindegyik csőbe adagoljon 1 ml friss, 3:1 Carnoy-féle fixálószert. Minden csövet szorosan zárjon le, és fordítsa fel őket. (Ez a fixálás előtti lépés.)
15. Centrifugálja a csöveket 8 percig 1000 rpm-en.

16. Szívja le a felülúszót mindegyik csőről, körülbelül 1 ml-t hagyva a sejtpellet felett. Ügyeljen arra, hogy ne szívja le a pelletet. Ügyeljen a szálas anyagra, amely a centrifugálás után a sejtpelletből a felülúszóba kerülhet. Lehet, hogy az utolsó néhány ml felülúszót kézzel kell eltávolítani egy Pasteur-pipettával (nem vákuumszívással) a teljes sejtpellet hulladéktartályba szívásának elkerülése érdekében.
17. Szuszpendálja fel újra a sejtpelletet a 7. lépésben leírtak szerint.
18. Cseppenként adjon hozzá 3–4 ml friss, 3:1 Carnoy-féle fixálószert.
19. Adja hozzá a maradék fixálót; a teljes térfogat így 7 ml lehet.
20. Ismételje meg a 16–18. lépést mindegyik csővel.
21. Hagyja állni 10 percen át szobahőmérsékleten. (Ez az első fixálási lépés.)
22. Centrifugálja a csöveket 8 percig 1000 rpm-en.
23. Szívja le a felülúszót, körülbelül 1 ml-t hagyva a pellet felett. Szuszpendálja fel újra a sejtpelletet.
24. Adjon hozzá fixálót, 7 ml-ig. Centrifugálja a csöveket 8 percig 1000 rpm-en. (A fixálás második lépése.)
25. Ismételje meg a 23–24. lépést. (A fixálás harmadik lépése.)
26. Ekkor a fixált sejtpelletek azonnal felhasználhatók metszetkészítéshez a laboratórium standard protokollja szerint, vagy hűtőszekrényben (2–8 °C között), illetve fagyasztóban tárolhatók későbbi felhasználásra.

KLINIKAI ALKALMAZÁSOK

A modális humán kromoszómaszám 46. A humán kromoszómákat a hosszuk és a centromer helyzete alapján osztályozták (Denver-osztályozás). A kromoszóma-felépítés rendellenességei számos veleszületett rendellenességgel hozhatók összefüggésbe, például a Down-szindrómával (jellemzően egy további kis autoszóma) és a határozatlan szexualitáshoz kapcsolódó szindrómákkal (Turner-szindróma, Klinefelter-szindróma és egyéb szindrómák, amelyek esetén a nemi kromoszómák rendellenesek). Szerzett kromoszóma-rendellenesség észlelhető a krónikus mieloid leukémia leukocitáinak egy részében (a „Philadelphia" kromoszóma), és a kezelés előrehaladását ezen marker követésével lehet értékelni. Mivel a sugárterápiában közelítik a toleranciahatárt, a szokatlan kromoszóma-felépítéssel rendelkező sejtek aránya jelentősen megnő, és ezeknek a sejteknek a megjelenését használják útmutatóként a dózis megállapításához.

TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

A CHANG Medium MF médiumot fagyasztva, –10 °C alatt tárolja a felhasználásig. A CHANG Medium MF stabil az üveg címkéjén feltüntetett lejárati időpontig, amennyiben fagyasztva tárolják. A felolvasztást követően a fel nem használt termék munkaalikvotokra osztható, és későbbi használatra újra lefagyasztható (legfeljebb kétszer), vagy szorosan lezárva 2 és 8 °C közötti hőmérsékleten, legfeljebb 30 napig tárolható. Védje a fluoreszcens fénytől.

ÓVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK

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

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

LIETUVIŲ K.

NAUDOJIMO INDIKACIJA

„CHANG Medium MF“ terpė yra paruošta naudoti terpė be mitogenų, skirta naudoti kultivuojant periferinio kraujo ir kitus mėginius citogenetinės analizės tikslais.

ĮTAISO APRAŠYMAS

„CHANG Medium MF“ sudėtyje yra RPMI terpės su 20 % FBS, 2 mM glutamino, 20 mM HEPES buferio ir antibiotiko gentamicino sulfato. Norint optimizuoti periferinio kraujo ar kitokių ląstelių augimą, terpę gali prireikti papildyti mitogeninėmis medžiagomis, pvz., fitohemagliutininu (PHA). Kiekviena laboratorija turi pati nusistatyti reikiamą PHA (ar kitų mitogenų) koncentraciją.

SUDEDAMOSIOS DALYS

Aminorūgštis

Argininas
Asparaginas
Asparto rūgštis
Cistinas
Glutamo rūgštis
Glutaminas
Glicinas
Histidinas
Izoleucinas
Leucinas
Lizinas
Metioninas
Fenilalaninas
Prolinas
Serinas
Treoninas
Triptofanas
Tirozinas
Valinas

Vanduo

Injekcinio vandens kokybė

Baltymai, hormonai ir augimo faktoriai

Jaučio embriono kraujo serumas (FBS)

pH indikatorius

Fenolio raudonasis

Kita

Biotinas
Hidroksiprolinas
Glutationas

Buferiai

Natrio bikarbonatas
HEPES

Energetiniai substratai

Gliukozė
Inozitolis

Druskos ir jonai

Natrio chloridas
Cholino chloridas
Kalcio nitratas
Kalio chloridas
Magnio sulfatas
Natrio fosfatas

Antibiotikas

Gentamicino sulfatas

Vitaminai ir mikroelementai

Folio rūgštis
Nikotinamidas
Riboflavinas
Tiaminas
Pantoteninė rūgštis
Kobalaminas
Piridoksinas
Aminobenzoinė rūgštis

KOKYBĖS UŽTIKRINIMAS

STERILUMAS

Serumas, naudotas gaminant „CHANG Medium MF“ terpę, virusinių užkratų atžvilgiu yra ištirtas pagal 9 CFR kodekso 113.53 dalies standartus. Jis taip pat buvo patikrintas, ar nėra mikoplazmos užteršimo. „CHANG Medium MF“ terpė yra sterilizuota filtruojant per 0,1 mikrono filtrus. „CHANG Medium MF“ terpės mėginiai yra išbandyti bakteriologinio užkrėtimo rizikai nustatyti pagal šiuo metu patvirtintą Jungtinių Valstijų farmakopėjos (USP) sterilumo bandymų protokolą <71>.

Gautiems rezultatams įtakos gali turėti keletas veiksnių, įskaitant mėginio šaltinį, kultūros auginimo sąlygas ir reagentų pasirinkimą. Rekomenduojama prieš pradedant kiekvienos naujos partijos reagentus naudoti reguliariai, juos pirmiausia išbandyti lyginant su tuo pat metu tiriamais pamatinės žinomo tinkamo aktyvumo medžiagos bandiniais.

Tiriant periferinio kraujo mėginius, kiekvienos „CHANG Medium MF“ partijos reagentų mitozinis indeksas, chromosomų ilgis ir kokybė palyginti su kontroline terpe. Rezultatai pateikiami atskiroms partijoms parengtuose analizės sertifikatuose.

REIKALINGOS, BET PAKUOTĖJE NEPATEIKTOS MEDŽIAGOS IR ĮRANGA

1. Fitohemagliutinino (PHA) tirpalas (9 mg/ml), sterilus
2. Heparinas be fenolio
3. Kolcemido 25 µg/ml tirpalas
4. Kalio chlorido tirpalas, 75 mM
5. Alkoholinis acto rūgšties tirpalas, 1 dalis ledinės acto rūgšties: 3 dalys metanolio (analizinių reagentų standartas)
6. Giemsa arba 2 % acetoorceino dažai
7. Chromo rūgštis
8. Tepinėlių klijai
9. Objektiniai ir dengiamieji stikleliai
10. Plastikiniai centrifuginiai mėgintuvėliai
11. CO_2 inkubatorius
12. Stalinė centrifuga
13. Sūkurinė maišyklė
14. Šviesinis mikroskopas

MĖGINIŲ ĖMIMAS IR RUOŠIMAS

Viso kraujo ląstelių kultūrų citogenetinės analizės sėkmei įtakos turi mėginio paėmimo metu normaliai funkcionuojančių limfocitų kiekis. Šiam kiekiui poveikio gali turėti infekcija ir vaistai, todėl, jei tik įmanoma, tiriamieji 7 dienas prieš kraujo ėmimą citogenetiniams tyrimams neturėtų vartoti vaistų. Panašiai mitozinis indeksas gali labai sumažėti anerginių kai kurių ligų stadijų metu (pvz., Hodžkino ligos, sarkoidozės ir kt.), taip pat, ne taip smarkiai, – sveikoms moterims vėlyvuoju nėštumo laikotarpiu. Limfocitų kultūroms ruošiamų kraujo mėginių negalima maišyti su konservantais. Kritiškai svarbu laikytis aseptikos reikalavimų.

Jei įmanoma, kraujo mėginius reikia tirti nedelsiant. Esant absoliučiai būtinybei, juos galima laikyti 2 °C–8 °C temperatūroje, bet ne ilgiau kaip 48 valandas.

PARUOŠIMAS NAUDOTI

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

Pastaba. „CHANG Medium MF“ terpėje dažnai susidaro kalcio karbonato kristalų. Nenustatyta, kad šių kristalų buvimas kaip nors pakenktų produkto funkcinėms savybėms.

NAUDOJIMO NURODYMAI

Citogenetiniams tyrimams naudojami ir viso kraujo, ir išskirtų leukocitų mėginiai, bet pirmieji yra paprastesni ir plačiausiai analizuojami įprastinių tyrimų metu. Kaip ir visų ląstelių kultūrų auginimo atveju, optimalūs rezultatai priklauso nuo tinkamų kultivavimo sąlygų sukūrimo. Santykinis aktyvios PHA koncentracijos kiekis įvairių serijų reagentuose gali skirtis, todėl gali būti pravartu tirti dvi PHA koncentracijas.
Išsamesnių šių produktų naudojimo gairių kiekviena laboratorija turi ieškoti savo vidaus darbo tvarkos taisyklėse ir metodiniuose nurodymuose, specialiai parengtuose ir optimizuotuose pagal atskiros medicininės programos nuostatas.

I. Mėginių ruošimas

Paimkite suaugusiesiems 5–10 ml, o vaikams – 2–3 ml šviežio kraujo natrio heparine.

- Visą kraują reikia paimti kambario temperatūroje ir sumaišyti vartant.
- Iš viso kraujo išskirtus limfocitus galima stimuliuoti fitohemagliutininu (PHA) ir galima auginti naudojant sinchronizavimo metodą.

II. Viso kraujo pasėlis

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

1. Prieš mėginio inokuliavimą sušildykite „CHANG Medium MF“ iki aplinkos temperatūros.
2. PHA atskieskite steriliu švirkštu įšvirkšdami 5 ml sterilaus distiliuoto vandens.
3. Steriliu metodu paruoškite kiekvienam pasėlio indui reikalingus po 5 ml „CHANG Medium MF“.
4. Į kiekvieną pasėlio indą įlašinkite 0,1 ml atskiestos PHA.
5. Inokuliuokite 0,3 ml mėginio kiekvienam pasėliui. Jeigu pacientas yra kūdikis (< 1 mėnesio), inokuliuokite 0,2 ml mėginio.
6. Kiekviena laboratorija turi nustatyti, kokį skaičių pasėlių paruošti, tai priklauso nuo paciento klinikinės indikacijos ir amžiaus. Naujagimių (< 1 mėnesio) mėginius papildomai auginkite dar 48 valandas nesinchronizuodami.
7. Inkubuokite pasėlius 35–39 °C temperatūroje, 5–8 % CO_2 aplinkoje, kol bus galima paimti.
8. Sinchronizavimui: po 48 inkubavimo valandų pridėkite į kiekvieną po 72 valandų paimamą pasėlį 50 µl metotreksato į 5 ml darbinį tirpalą. Praėjus 18–19 valandų po metotreksato pridėjimo (likus 5–6 valandoms iki paėmimo), pridėkite 100 µl timidino 5 ml darbinio tirpalo.

III. Kultūrų surinkimas

1. Išimkite paimti paruoštą pasėlį iš inkubatoriaus ir švelniai pamaišykite flakoną, kad resuspenduotumėte ląsteles.
2. Kiekvieno flakono turinį perpilkite į 15 ml talpos centrifuginį mėgintuvėlį.
3. Į kiekvieną pasėlio mėgintuvėlį įlašinkite po 40 µl pradinio kolcemido tirpalo (10 µg/ml). Mėgintuvėlius sandariai uždarykite dangteliais ir vartydami švelniai sumaišykite turinį.
4. Mėgintuvėlius inkubuokite 45 minutes 35–39 °C temperatūroje.
5. Po inkubacijos mėgintuvėlius 8 minutes centrifuguokite 1000 apsisukimų per minutę greičiu.
6. Atsargiai iš kiekvieno mėgintuvėlio įsiurbkite viršnuosėdinį skystį, naudodami vakuuminį įsiurbimo įtaisą su tirpiklio gaudykle. Būkite atsargūs ir neįsiurbkite ląstelių nuosėdų.
7. Resuspenduokite ląstelių nuosėdas, pirštu baksnodami kiekvieno mėgintuvėlio dugną arba šoną.
8. Įjunkite 20 minučių laikmatį.
9. Įlašinkite 3–4 ml pašildyto (35–37 °C) hipotoninio tirpalo (0,075 M kalio chlorido).
10. Sandariai dangteliu uždarykite mėgintuvėlį ir švelniai sumaišykite pirštu baksnodami mėgintuvėlio dugną arba šoną.
11. Įlašinkite 5–6 ml pašildyto (35–37 °C) hipotoninio tirpalo. Sandariai uždarykite mėgintuvėlį dangteliu ir jį apverskite.
12. Kiekvienam mėgintuvėliui pakartokite 8–10 veiksmus.
13. Palikite mėgintuvėlius vandens vonelėje 35–37 °C temperatūroje. Vieną kartą apverskite mėgintuvėlius praėjus pusei 20 minučių laikotarpio.
14. Pasibaigus 20 minučių laikotarpiui į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinkite 1 ml Karnojaus fiksacinio tirpalo santykiu 3:1. Kiekvieną mėgintuvėlį sandariai uždarykite dangteliu ir apverskite (tai yra veiksmas prieš fiksavimą).
15. Mėgintuvėlius 8 minutes centrifuguokite 1000 aps./min. greičiu.

16. Iš kiekvieno mėgintuvėlio įsiurbkite viršnuosėdinį skystį, palikdami maždaug 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 medžiagų. Paskutinius kelis supernatanto mililitrus gali tekti nusiurbti Pastero pipete (nenaudojant vakuuminio siurbimo), kad į atliekų konteinerį nebūtų įsiurbta visa ląstelių nuosėdų masė.
17. Ląstelių nuosėdas resuspenduokite, kaip aprašyta 7 veiksme.
18. Įlašinkite 3–4 ml šviežio Karnojaus fiksacinio tirpalo santykiu 3:1.
19. Pridėkite likusį fiksacinį tirpalą, kad bendras mėgintuvėlio tūris neviršytų 7 ml.
20. Kiekvienam mėgintuvėliui pakartokite 16–18 veiksmus.
21. Palikite 10 minučių kambario temperatūroje (tai yra pirmas fiksavimo veiksmas).
22. Mėgintuvėlius 8 minutes centrifuguokite 1000 aps./min. greičiu.
23. Nusiurbkite viršnuosėdinį skystį, palikdami apie 1 ml virš ląstelių nuosėdų. Resuspenduokite ląstelių nuosėdas.
24. Pridėkite fiksacinį tirpalą (ne daugiau kaip 7 ml). Mėgintuvėlius 8 minutes centrifuguokite 1000 aps./min. greičiu (antras fiksavimo veiksmas).
25. Pakartokite 23–24 veiksmus (trečias fiksavimo veiksmas).
26. 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.

KLINIKINIS TAIKYMAS

Modalinis žmogaus chromosomų skaičius yra 46. Žmogaus chromosomos yra klasifikuojamos pagal jų ilgį ir centromeros padėtį (Denverio klasifikacija). Chromosomų struktūros aberacijos siejamos su daugeliu paveldimų ligų, tokių kaip Dauno sindromas (paprastai nustatoma papildoma nedidelė autosoma) ir sindromais, susijusiais su neapibrėžtos lyties anomalijomis (Ternerio sindromas, Klainfelterio sindromas ir kiti, kai aptinkamos lytinių chromosomų pažaidos). Įgytosios chromosominės anomalijos gali būti aptinkamos tam tikroje leukocitų dalyje sergant lėtine mielocitine leukemija (Filadelfijos chromosoma), tad stebint šį žymenį galima vertinti ligos progresavimą. Kai spindulinės terapijos metu priartėjama prie toleravimo ribos, žymiai pagausėja neįprastos chromosominės struktūros ląstelių, remiantis šių ląstelių išvaizda, koreguojama dozė.

LAIKYMAS IR STABILUMAS

Iki naudojimo „CHANG Medium MF“ terpę reikia laikyti užšaldytą, žemesnėje kaip –10 °C temperatūroje. Laikant užšaldytą, „CHANG Medium MF“ terpė išlieka stabili iki tinkamumo datos, pažymėtos butelio etiketėje. Atitirpinus, nesunaudotą produkto likutį galima išpilstyti darbinėmis dalimis ir vėl užšaldyti (daugiausia du kartus) 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 Medium MF“ terpės sudėtyje yra FBS, todėl su ja dirbant reikia imtis įprastinių laboratorinės praktikos atsargumo priemonių. Terpės sudėtyje yra antibiotiko (gentamicino sulfato), skirto bakterinio užkrėtimo pavojui sumažinti, bet išpilstant terpę visuomet būtina laikytis metodinių aseptikos reikalavimų. Negalima naudoti jokios terpės, jei ji nėra raudonos spalvos.

TÜRKÇE

KULLANIM ENDİKASYONU

CHANG Medium MF, sitogenetik analiz amaçları doğrultusunda periferik kan ve diğer numunelerin kültürünün yapılmasında kullanıma yönelik, mitojen içermeyen, kullanmaya hazır bir vasattır.

CİHAZ TANIMI

CHANG Medium MF, %20 FBS içeren RPMI, 2 mM glutamin, 20 mM HEPES tamponu ve Gentamisin Sülfat antibiyotiğinden oluşur. Periferik kan ve başka hücrelerin gelişimini optimize etmek için fitohemaglutinin (PHA) gibi mitojenik ajanların eklenmesini gerektirebilir. Gerekli PHA (veya diğer mitojen) konsantrasyonu ayrı laboratuvar tarafından belirlenmelidir.

BİLEŞENLER

Amino Asit

Arjinin
Asparajin
Aspartik Asit
Sistin
Glutamik Asit
Glutamin
Glisin
Histidin
İzolösin
Lösin
Lizin
Metiyonin
Fenilalanin
Prolin
Serin
Treonin
Triptofan
Tirozin
Valin

Su

Enjeksiyonluk Su Kalitesi

Proteinler, Hormonlar ve Büyüme Faktörleri

Fetal sığır serumu (FSS)

pH Göstergesi

Fenol kırmızısı

Diğer

Biyotin
Hidroksiprolin
Glutatyon

Tamponlar

Sodyum bikarbonat
HEPES

Enerji Substratları

Glukoz
İnositol

Tuzlar ve İyonlar

Sodyum klorür
Kolin klorür
Kalsiyum nitrat
Potasyum klorür
Magnezyum sülfat
Sodyum fosfat

Antibiyotik

Gentamisin Sülfat

Vitaminler ve eser elementler

Folik asit
Nikotinamid
Riboflavin
Tiyamin
Pantotenik asit
Kobalamin
Piridoksin
Aminobenzoik asit

KALİTE GÜVENCE

STERİLİTE

CHANG Medium MF üretiminde kullanılan serum CFR Başlık 9 Kısım 113.53 uyarınca viral kontaminasyon için test edilmiştir. Ayrıca mikoplazma kontaminasyonu için taranmıştır. CHANG Medium MF 0,1 mikron bir filtreden filtrasyon yoluyla sterilize edilmiştir. CHANG Medium MF örnekleri mevcut USP Sterilite testi <71> içinde tanımlanan sterilite testi protokolü izlenerek olası bakteriyolojik kontaminasyon açısından test edilir.

Örnek kaynağı, 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 materyalle birlikte çalışmaları önerilir.

Her CHANG Medium MF lotu periferik kan kullanılarak bir kontrol vasatına göre mitotik indeks, kromozom uzunluğu ve kalite için değerlendirilir. Sonuçlar lota özel bir Analiz Sertifikasında bildirilir.

GEREKLİ AMA SAĞLANMAYAN MATERYAL VE EKİPMAN

1. Fitohemaglutinin (PHA) Solüsyonu (9 mg/mL), Steril
2. Fenol İçermeyen Heparin
3. Colcemid 25 µg/mL Solüsyonu
4. Potasyum Klorür Solüsyonu, 75 mM
5. Asetik Alkol, 1 kısım Glasiyal Asetik Asit: 3 kısım Metanol (Analitik Reaktif Sınıfı)
6. Giemsa veya %2 Asetik Asit-orsein
7. Kromik asit
8. Gömme ortamı
9. Cam Lamlar ve Lameller
10. Plastik Santrifüj Tüpleri
11. CO_2 İnkübatörü
12. Tezgah Santrifüjü
13. Vorteks Karıştırıcı
14. Işık Mikroskobu

NUMUNE TOPLAMA VE MUAMELE

Sitogenetik analiz için tam kan kültürlerinin başarısı örnekleme zamanında normal fonksiyonu olan lenfosit düzeyinden etkilenir. Bu seviye enfeksiyon ve ilaçlardan etkilenebileceğinden mümkün olduğunda sitogenetik çalışmalar öncesinde hastalar, testler için kan toplanmasından önce 7 gün ilaç almamış olmalıdır. Benzer şekilde mitotik indeks bazı hastalıkların (örn. Hodgkin hastalığı, sarkoidoz, vs.) anerjik fazlarında ve daha az derecede gebeliğin daha geç evrelerindeki normal kişilerde önemli ölçüde azalabilir. Lenfosit kültürü için kan örneklerine koruyucu madde eklenmemelidir. Aseptik teknikler şarttır.

Kan örnekleri mümkün olduğunda gecikmeden test edilmelidir. Mutlaka gerekliyse 2°C ile 8°C arasında 48 saatten uzun süre saklanabilirler.

KULLANIM HAZIRLIĞI

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

Not: CHANG Medium MF içinde sıklıkla kalsiyum karbonat kristalleri oluşur. Bu kristallerin varlığının ürün performansı üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi olduğu gösterilmemiştir.

KULLANMA TALİMATI

Sitogenetik çalışmalar için tam kan veya ayrılmış lökositler kullanılmıştır ama rutin çalışmalarda kullanım açısından en basit olan ve en yaygın olarak kullanılan öncekidir. Her hücre kültürü işleminde olduğu gibi optimum sonuçlar yeterli kültür koşullarının elde edilmesine bağlıdır. Relatif aktif PHA içeriği farklı partiler arasında biraz değişiklik gösterebileceğinden iki PHA konsantrasyonunu test etmek faydalı olabilir.

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

I. Örnek Hazırlama:

Sodyum heparin içinde yetişkinler için 5-10 mL ve çocuklar için 2-3 mL kan alın.

- Tam kan oda sıcaklığında aktarılmalı ve ters çevrilerek karıştırılmalıdır.
- Tam kandan alınan lenfositler fitohemaglutinin (PHA) ile stimüle edilebilir ve senkronizasyon tekniğiyle kültürü yapılabilir.

II. Tam Kan Kültürü:

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

1. Numune inokülasyonundan önce CHANG Medium MF ürününü ortam sıcaklığına getirin.
2. PHA ürününü steril bir şırınga kullanarak 5 mL steril distile su ekleyerek sulandırın.
3. Her kültür vasatı için gereken 5 mL CHANG Medium MF ürününü aseptik teknik kullanarak hazırlayın.
4. Kültür kabı başına 0,1 mL sulandırılmış PHA ekleyin.
5. Kültür başına 0,3 mL örnek inokülasyonu yapın. Hasta bir infantsa (<1 aylık) 0,2 mL örnekle inokülasyon yapın.
6. Her ayrı laboratuvar hastanın klinik endikasyonuna ve yaşına göre kurulacak kültür sayısını belirlemelidir. Yenidoğanlardan (<1 aylık) gelen numunelerde senkronizasyon yapılmadan ek bir 48 saatlik kültür başlatılacaktır.
7. Toplamaya hazır oluncaya kadar kültürleri ellemeden 35°C - 39°C'de %5 - %8 CO_2 atmosferi altında inkübe edin.
8. Senkronizasyon için: 48 saat inkübasyondan sonra 72 saatte toplanacak her 5 mL kültür başına 50 µL Metotreksat working solution ekleyin. Metotreksatı eledikten 18-19 saat sonra (toplama zamanından 5-6 saat önce) her 5 mL kültür başına 100 µL Timidin working solution ekleyin.

III. Kültürlerden Toplama:

1. Toplamaya hazır kültürü inkübatörden çıkarın ve hücrelerin tekrar süspansiyonu için flaskı yavaşça çevirin.
2. Her flaskın içeriğini bir 15 mL santrifüj tüpüne aktarın.
3. Her kültür tüpüne 40 µL stok Colcemid (10 µg/mL) ekleyin. Tüplerin kapağını sıkıca kapatın ve ters düz ederek yavaşça karıştırın.
4. Tüpleri 35°C - 39°C'de 45 dakika inkübe edin.
5. İnkübasyondan sonra tüpleri 8 dakika boyunca 1000 devir/dk hızında santrifüjleyin.
6. Her tüpten süpernatanı solvent tuzaklı bir vakumlu aspiratör kullanarak dikkatle aspire edin. Pelleti aspire etmemeye dikkat edin.
7. Pelleti her tüpün altına ve yan tarafına parmağınızla vurarak tekrar süspansiyon haline getirin.
8. 20 dakikalık bir zamanlayıcı başlatın.
9. 3 - 4 mL önceden ısıtılmış (35 - 37°C) hipotonik solüsyon (0,075 M Potasyum Klorür) ekleyin.
10. Tüpün kapağını sıkıca kapatın ve tüpün altına ve yan tarafına parmağınızla vurarak yavaşça karıştırın.
11. 5 - 6 mL önceden ısıtılmış (35 - 37°C) hipotonik solüsyonu damla damla ekleyin. Kapağını sıkıca kapatıp tüpü ters düz edin.
12. Her tüp için 8 - 10. adımları tekrarlayın.
13. Bir su banyosu kullanarak tüpleri 35 - 37°C'de dik tutun. 20 dakikalık zamanlayıcının orta noktasında tüpleri bir kez ters düz edin.
14. 20 dakika zamanlayıcı bittiğinde her tüpe 1 mL taze 3:1 Carnoy's Fixative ekleyin. Kapağını sıkıca kapatıp her tüpü ters düz edin. (Bu Prefiksatif adımıdır)
15. Tüpleri 8 dakika boyunca 1000 devir/dk hızında santrifüjleyin.
16. Her tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelletinin üzerinde yaklaşık 1 mL bırakın. Pelleti aspire etmemeye dikkat edin. Santrifüjlemeden sonra hücre pelletinden yukarıya süpernatan içine uzanabilecek fibröz materyal açısından dikkatli olun. En son birkaç mL süpernatanın tüm hücre pelletinin atık kabına aspirasyonundan kaçınmak üzere bir Pasteur pipetiyle (vakum aspirasyonu kullanmadan) alınması gerekebilir.

17. Hücre pelletini 7. Adımda tanımlandığı gibi tekrar süspansiyon haline getirin.
18. 3 - 4 mL taze 3:1 Carnoy's Fixative ürününü damla damla ekleyin.
19. Kalan fiksatifi 7 mL toplam hacme kadar ekleyin.
20. Her tüp için 16 - 18. adımları tekrarlayın.
21. Oda sıcaklığında 10 dakika bırakın. (Bu Birinci fiksatif adımıdır).
22. Tüpleri 8 dakika boyunca 1000 devir/dk hızında santrifüjleyin.
23. Süpernatanı aspire edip pellet üzerinde yaklaşık 1 mL bırakın. Pelleti tekrar süspansiyon haline getirin.
24. 7 mL toplam hacme kadar fiksatif ekleyin. Tüpleri 8 dakika boyunca 1000 devir/dk hızında santrifüjleyin. (İkinci fiksatif adımı).
25. 23 - 24. adımları tekrarlayın. (Üçüncü fiksatif adımı).
26. Bu noktada sabit hücre pelletleri laboratuvarın standart protokolüne göre lam hazırlama için hemen kullanılabilir veya gelecekte kullanım için buzdolabında (2°C - 8°C) veya dondurucuda saklanabilir.

KLİNİK UYGULAMALAR

Modal insan kromozom sayısı 46'dır. İnsan kromozomları uzunlukları ve sentromer konumlarına göre sınıflandırılmıştır (Denver Sınıflandırması). Kromozomal yapı aberasyonları Down sendromu (tipik olarak ek bir küçük otozom ile) ve belirsiz cinsellik ile ilişkili sendromlar (Turner sendromu, Klinefelter sendromu ve diğerleri, bunlarda seks kromozomlarının anormal olduğu görülür) gibi çeşitli konjenital bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. Kronik miyelositik lösemide lökositlerin bir kısmında akkiz bir kromozom anomalisi ("Philadelphia" kromozomu) saptanabilir ve tedavinin ilerlemesi bu belirteç kullanılarak değerlendirilebilir. Radyasyon tedavisinde tolerans sınırına yaklaşıldıkça tuhaf kromozom yapısına sahip hücrelerin oranında belirgin bir artış olur ve bu hücrelerin görünümü doz için bir kılavuz olarak kullanılmıştır.

SAKLAMA VE STABİLİTE

CHANG Medium MF ürününü kullanıma hazır oluncaya kadar dondurulmuş olarak –10°C altında saklayın. CHANG Medium MF dondurulmuş olarak muhafaza edildiğinde şişe etiketinde gösterilen son kullanma tarihine kadar stabildir. Çözdükten sonra kullanılmamış herhangi bir ürün çalışma alikotlarına aktarılıp daha sonra kullanılmak üzere (maksimum iki kez) 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 Medium MF, FSS içerir ve evrensel laboratuvar önlemlerine göre kullanılmalıdır. Vasat, bakteriyel kontaminasyon potansiyelini azaltmak için bir antibiyotik (gentamisin sülfat) içerir ama vasatı verirken daima aseptik teknikler kullanılmalıdır. Kırmızı renkte olmayan herhangi bir vasatı kullanmayın.

SLOVENČINA

INDIKÁCIA NA POUŽITIE

CHANG Medium MF je médium bez obsahu mitogénov pripravené na použitie pri kultivácii periférnej krvi a iných vzoriek pre účely cytogenetickej analýzy.

POPIS ZARIADENIA

CHANG Medium MF je zložené z RPMI obsahujúceho 20 % FBS, 2 mM glutamínu, 20 mM pufra HEPES a antibiotikum gentamicínsulfát. Môže si vyžadovať pridanie mitogenických činidiel, ako napríklad fytohemaglutinín (PHA), na optimalizáciu rastu periférnej krvi a iných buniek. Požadovanú koncentráciu PHA (alebo iných mitogénov) si stanoví jednotlivé laboratórium.

ZLOŽKY

Aminokyseliny

arginín
asparagín
kyselina asparágová
cystín
kyselina glutámová
glutamín
glycín
histidín
izoleucín
leucín
lyzín
metionín
fenylalanín
prolín
serín
treonín
tryptofán
tyrozín
valín

Voda

kvalita vody na injekciu

Bielkoviny, hormóny a rastové faktory

fetálne bovinné sérum (FBS)

Indikátor pH

fenolová červeň

Iné

biotín
hydroxyprolín
glutatión

Pufre

hydrogénuhličitan sodný
HEPES

Energetické substráty

glukóza
inositol

Soli a ióny

chlorid sodný
cholín vápenatý
dusičnan vápenatý
chlorid draselný
síran horečnatý
fosfát sodný

Antibiotikum

gentamicínsulfát

Vitamíny a stopové prvky

kyselina listová
nikotínamid
riboflavín
tiamín
kyselina pantoténová
kobalamín
pyridoxín
kyselina aminobenzoová

KONTROLA KVALITY

STERILITA

Sérum použité pri výrobe CHANG Medium MF bolo testované na vírusovú kontamináciu podľa CFR, kapitoly 9, časti 113.53. Podstúpilo tiež skríning na mykoplazmatickú kontamináciu. CHANG Medium MF je sterilizované filtráciou cez 0,1-mikrónový filter. Vzorky CHANG Medium MF sú testované na možnú bakteriologickú kontamináciu podľa protokolu na testovanie sterility popísaného v aktuálnom teste sterility USP <71>.

Viaceré faktory, vrátane zdroja vzorky, podmienok kultivácie a výberu reagencií, môžu ovplyvniť získaný výsledok. Používateľom sa odporúča, aby každú novú šaržu reagencie spustili paralelne s referenčným materiálom známej vhodnej aktivity predtým, než ju začnú bežne používať.

Každá šarža CHANG Medium MF sa hodnotí použitím periférnej krvi na mitotický index, dĺžku chromozómov a kvalitu porovnaním s kontrolným médiom. Výsledky sa zaznamenávajú na certifikát analýzy pre špecifickú šaržu.

VYŽADOVANÉ, NO NEDODÁVANÉ MATERIÁLY A VYBAVENIE

1. Roztok fytohemaglutinínu (PHA) (9 mg/ml), sterilný
2. Heparín neobsahujúci fenol
3. Roztok Colcemidu 25 µg/ml
4. Roztok chloridu draselného, 75 mM
5. Kyselina alkoholová, 1 časť ľadová kyselina octová: 3 časti metanol (kvality analytickej reagencie)
6. Giemsa alebo 2 % kyselina octová – orceín
7. Kyselina chromitá
8. Krytie
9. Sklíčka a krycie sklíčka
10. Plastové skúmavky na odstreďovanie
11. Inkubátor CO_2
12. Laboratórna odstredivka
13. Vírivý mixér
14. Svetelný mikroskop

ODBER VZORIEK A MANIPULÁCIA SO VZORKAMI

Úspešnosť kultúr z plnej krvi na cytogenetickú analýzu je ovplyvnená hladinou lymfocytov s normálnou funkcie v čase odberu vzorky. Pretože táto hladina môže byť ovplyvnená infekciou a liekmi, vždy, keď je to možné, subjekty v cytogenetických štúdiách by nemali brať lieky 7 dní pred odberom krvi na testovanie. Mitotický index môže byť podobne veľmi znížený počas anergických fáz určitých ochorení (napríklad Hodgkinsova choroba, sarkoidóza atď.) a do menšej miery aj u normálnych osôb v neskorších štádiách tehotenstva. Do vzoriek krvi na kultiváciu lymfocytov sa nesmie pridávať konzervačné činidlo. Aseptické techniky sú kriticky dôležité.

Vzorky krvi by sa mali testovať neodkladne vždy, keď je to možné. Ak je to absolútne nevyhnutné, možno ich uchovávať pri teplote 2 °C až 8 °C nie dlhšie než 48 hodín.

PRÍPRAVA NA POUŽITIE

Rozmrazte cez noc v chladničke (2 °C – 8 °C), potom zľahka premiešajte, aby sa zaistila homogénnosť. Asepticky nadávkujte 10 ml média do sterilných fľaštičiek na kultúru a ustáľte na teplotu 37 °C na okamžité použitie.

Poznámka: V CHANG Medium MF sa bežne tvoria kryštály uhličitanu vápenatého. Nepreukázalo sa, že by prítomnosť týchto kryštálov mala dopad na výkon tohto produktu.

NÁVOD NA POUŽITIE

Leukocyty z plnej krvi alebo separované leukocyty sa používajú na cytogenetické štúdie, no najjednoduchšie a najčastejšie používané v bežných štúdiách sú leukocyty z plnej krvi. Tak ako pri všetkých postupoch kultivácie buniek, optimálne výsledky závisia na vytvorení primeraných podmienok na kultiváciu. Pretože relatívny obsah aktívneho PHA sa môže mierne líšiť medzi šaržami, môže byť užitočné otestovať dve koncentrácie PHA.

Ďalšie podrobnosti o použití týchto produktov by malo každé laboratórium čerpať zo svojich vlastných laboratórnych postupov a protokolov, ktoré boli špecificky vypracované a optimalizované pre váš individuálny medicínsky program.

I. Príprava vzorky:

Odoberte 5 – 10 ml čerstvej krvi do heparínu sodného pre dospelých, a 2 – 3 ml pre deti.

- Plná krv by sa mala prepravovať pri izbovej teplote a premiešať prevrátením.
- Lymfocyty z plnej krvi možno stimulovať fytohemaglutinínom (PHA) a možno ich kultivovať synchronizačnou technikou.

II. Kultúra z plnej krvi:

Všetky nádoby s kultúrami označte menom pacienta, číslom vzorky a typom kultúry.

1. Pred naočkovaním vzorky CHANG Medium MF vytemperujte na okolitú teplotu.
2. PHA rekonštituujte pridaním 5 ml sterilnej destilovanej vody pomocou sterilnej striekačky.
3. Aseptickou technikou pripravte 5 ml CHANG Medium MF potrebného pre každú kultivačnú nádobu.
4. Do každej kultivačnej nádoby pridajte 0,1 ml rekonštituovaného PHA.
5. Naočkujte 0,3 ml vzorky na kultúru. Ak je pacient novorodenec (vek <1 mesiac), naočkujte 0,2 ml vzorky.
6. Každé jednotlivé laboratórium si má určiť počet kultúr na stanovenie podľa klinickej indikácie a veku pacienta. Ďalšia 48-hodinová kultivácia sa má začať na vzorkách od novorodencov (vek <1 mesiac) bez synchronizácie.
7. Kultúry inkubujte pri teplote 35 °C – 39 °C, v atmosfére 5 % – 8 % CO_2, kým nie sú pripravené na zber.
8. Na synchronizáciu: Po 48-hodinovej inkubácii pridajte 50 µl pracovného roztoku metotrexátu do každej 5 ml kultúry na zber po 72 hodinách. Do každej kultúry pridajte 100 µl pracovného roztoku tymidínu do každej 5 ml kultúry 18 – 19 hodín po pridaní metotrexátu (5 – 6 hodín pred zberom).

III. Zber kultúr:

1. Kultúru pripravenú na zber vyberte z inkubátora a jemne zavírte fľaštičkou, aby sa bunky resuspendovali.
2. Obsah každej fľaštičky preneste do 15 ml skúmavky na odstreďovanie.
3. Do každej skúmavky na kultiváciu pridajte 40 µl kmeňového Colcemidu (10 µg/ml). Na skúmavky natesno nasaďte vrchnáky a premiešajte prevrátením.
4. Skúmavky inkubujte pri teplote 35 °C – 39 °C 45 minút.
5. Po inkubácii skúmavky odstreďujte 8 minút pri 1 000 otáčok za minútu.
6. Z každej skúmavky pozorne aspirujte supernatant pomocou vákuového aspirátora s fľašou na zachytávanie rozpúšťadla. Dajte pozor, aby ste neodsali pelety.
7. Peletu resuspendujte poklopkaním prstom na dno alebo bok každej skúmavky.
8. Nastavte časovač na 20 minút.
9. Po kvapkách pridajte 3 – 4 ml zahriateho (35 °C – 37 °C) hypotonického roztoku (0,075 M chloridu draselného).
10. Na skúmavky natesno nasaďte vrchnáky a zľahka premiešajte poklopkaním prstom na dno alebo bok skúmavky.
11. Po kvapkách pridajte 5 – 6 ml zahriateho (35 °C – 37 °C) hypotonického roztoku. Na skúmavku natesno nasaďte vrchnák a prevráťte ju.
12. Kroky 8 – 10 zopakujte pre každú skúmavku.
13. Použite vodný kúpeľ a skúmavky nechajte postáť pri teplote 35 °C – 37 °C. Uprostred 20-minútového časovania skúmavku raz prevráťte.
14. Na konci každého 20-minútového časovania pridajte do každej skúmavky 1 ml čerstvého fixačného roztoku Carnoy 3:1. Natesno nasaďte vrchnák a každú skúmavku prevráťte. (Toto je krok pred fixáciou.)
15. Skúmavky odstreďujte 8 minút pri 1 000 otáčok za minútu.

16. Z každej skúmavky aspirujte supernatant a ponechajte asi 1 ml nad bunkovou peletou. Dajte pozor, aby ste neodsali pelety. Dávajte pozor na vláknitý materiál, ktorý môže trčať z bunkovej pelety do supernatantu po odstredení. Posledných pár ml supernatantu môže byť potrebné odstrániť ručne Pasteurovou pipetou (bez použitia vákuového odsávania), aby sa do odpadovej nádoby neaspirovala celá bunková peleta.
17. Bunkovú peletu resuspendujte tak, ako je popísané v kroku 7.
18. Po kvapkách pridajte 3 – 4 ml čerstvého fixačného roztoku Carnoy 3:1.
19. Pridajte zvyšný fixačný roztok do 7 ml.
20. Kroky 16 – 18 zopakujte pre každú skúmavku.
21. Nechajte postáť 10 minút pri izbovej teplote. (Toto je prvý fixačný krok.)
22. Skúmavky odstreďujte 8 minút pri 1 000 otáčok za minútu.
23. Aspirujte supernatant, pričom ponechajte asi 1,0 ml nad peletou. Resuspendujte bunkovú peletu.
24. Pridajte fixačný roztok do 7 ml. Skúmavky odstreďujte 8 minút pri 1 000 otáčok za minútu. (Druhý fixačný krok.)
25. Zopakujte kroky 23 – 24. (Tretí fixačný krok.)
26. V tomto bode možno zafixované bunkové pelety okamžite použiť na prípravu sklíčok podľa štandardného protokolu laboratória alebo uchovať v chladničke (2 °C – 8 °C) alebo mrazničke na budúce použitie.

KLINICKÉ APLIKÁCIE

Počet modálnych ľudských chromozómov je 46. Ľudské chromozómy sú klasifikované podľa svojej dĺžky a polohy centroméry (denverská klasifikácia). Odchýlky od chromozomálneho zloženia sa spájajú s rôznymi vrodenými poruchami, ako je Downov syndróm (typicky s pridaným malým autozómom) a syndrómami neurčitého pohlavia (Turnerov syndróm, Klinefelterov syndróm a iné, kde sa pohlavné chromozómy ukážu ako abnormálne). Získanú chromozomálnu abnormalitu možno zistiť z pomeru leukocytov pri chronickej myelocytárnej leukémii („Philadelphský“ chromozóm) a progres liečby možno hodnotiť sledovaním tohto markeru. Pretože radiačná terapia sa blíži k limitu tolerancie, existuje významné zvýšenie pomeru buniek s bizarným chromozomálnym zložením a objavenie týchto buniek sa používa ako návod pri dávkovaní.

UCHOVÁVANIE A STABILITA

CHANG Medium MF uchovávajte zmrazené pri teplote pod -10 °C, až kým nebude pripravené na použitie. CHANG Medium MF bude stabilné až do dátumu exspirácie vytlačeného na označení fľaše, ak sa uchováva zmrazené. Po rozmrazení všetok nepoužitý produkt možno nadávkovať do pracovných alikvót a znovu zmraziť (maximálne dvakrát) na neskoršie použitie, alebo tesne nasadiť vrchnák a uchovávať pri teplote 2 °C až 8 °C do 30 dní. Chráňte pred fluorescenčným svetlom.

BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA A VAROVANIA

Toto zariadenie je určené na použitie personálom vyškoleným na procedúry, ktoré zahŕňajú aplikáciu, na ktorú je toto zariadenie určené.

CHANG Medium MF obsahuje FBS a musí sa s ním manipulovať s použitím všeobecných laboratórnych bezpečnostných opatrení. Médium obsahuje antibiotikum (gentamicínsulfát) na zníženie možnosti bakteriálnej kontaminácie, no pri dávkovaní médií sa vždy musia použiť aseptické techniky. Nepoužívajte žiadne médium, ktoré nemá červenú farbu.

БЪЛГАРСКИ

ПОКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

CHANG Medium MF е готова за употреба среда без митогени за използване при култивиране на периферна кръв и други спесимени за целите на цитогенетичен анализ.

ОПИСАНИЕ НА ИЗДЕЛИЕТО

CHANG Medium MF се състои от RPMI среда, съдържаща 20% FBS (фетален говежди серум), 2 mM глутамин, 20 mM буфер HEPES и антибиотик гентамицин сулфат. Може да изисква добавяне на митогенни агенти, например фитохемаглутинин (PHA) за оптимизиране на растежа на периферната кръв и други клетки. Необходимата концентрация на PHA (или други митогени) трябва да се определи от конкретната лаборатория.

КОМПОНЕНТИ

Аминокиселини

Аргинин
Аспарагин
Аспарагинова киселина
Цистин
Глутаминова киселина
Глутамин
Глицин
Хистидин
Изолевцин
Левцин
Лизин
Метионин
Фенилаланин
Пролин
Серин
Треонин
Триптофан
Тирозин
Валин

Вода

Качество – вода за инжектиране

Протеини, хормони и растежни фактори

Фетален говежди серум (FBS)

pH индикатор

Фенол, червен

Други

Биотин
Хидроксипролин
Глутатион

Буфери

Натриев бикарбонат
HEPES

Енергийни субстрати

Глюкоза
Инозитол

Соли и йони

Натриев хлорид
Холин хлорид
Калциев нитрат
Калиев хлорид
Магнезиев сулфат
Натриев фосфат

Антибиотик

Гентамицин сулфат

Витамини и микроелементи

Фолиева киселина
Никотинамид
Рибофлавин
Тиамин
Пантотенова киселина
Кобаламин
Пиридоксин
Аминобензоена киселина

КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

СТЕРИЛНОСТ

Серумът, използван в производството на CHANG Medium MF, е тестван за вирусна контаминация съгласно CFR Раздел 9 Част 113.53. Той също така е подложен на скрининг за микоплазмена контаминация. CHANG Medium MF е стерилизирана чрез филтрация през филтър от 0,1 микрона. Проби от CHANG Medium MF са тествани за възможна бактериологична контаминация съгласно протокола за тестване за стерилност, описан в актуалния тест за стерилност по USP <71>.

Няколко фактора, включително източника на проба, състоянието на културите и избора на реагенти, могат да повлияят на получения резултат. На потребителите се препоръчва всяка нова партида реагент да се изпълнява паралелно с референтен материал с установена подходяща активност преди въвеждане в рутинна употреба.

Всяка партида CHANG Medium MF е оценена чрез периферна кръв за митотичен индекс, хромозомна дължина и качество спрямо контролна среда. Резултатите са посочени в конкретния за партидата Сертификат за анализ.

НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ И ОБОРУДВАНЕ, КОИТО НЕ СА ДОСТАВЕНИ

1. Разтвор на фитохемаглутинин (PHA) (9 mg/ml), стерилен
2. Хепарин без фенол
3. Разтвор на колцемид, 25 µg/ml
4. Разтвор на калиев хлорид, 75 mM
5. Оцетен алкохол, 1 част ледена оцетна киселина: 3 части метанол (клас аналитичен реагент)
6. Гимза или 2% оцетна киселина-орсеин
7. Хромна киселина
8. Обемозаместителна среда
9. Стъклени слайдове и покривни стъкла
10. Пластмасови центрофужни епруветки
11. CO_2 инкубатор
12. Настолна центрофуга
13. Вихров миксер
14. Светлинен микроскоп.

СЪБИРАНЕ И ОБРАБОТКА НА СПЕСИМЕН

Успехът при култури на цяла кръв за цитогенетичен анализ се влияе от нивото на лимфоцити с нормална функция към момента на вземане на проба. Тъй като това ниво може да бъде засегнато от инфекция или лекарства, когато е възможно, пациентите за цитогенетично изследване не трябва да приемат лекарства 7 дни преди вземането на кръв за тестове. По подобен начин миотичният индекс може да е значително понижен по време на анергични фази (отслабен имунен отговор) на някои болести (напр. болест на Ходжкин, саркоидоза и др.) и в по-малка степен при нормални индивиди по време на най-късните етапи на бременността. Консерванти не трябва да се добавят към кръвни проби за култура на лимфоцити. Асептичните методи са от изключително важно значение.

Кръвните проби трябва да се изследват без забавяне, когато е възможно. Ако е наложително, те могат да се съхраняват при температура от 2° C до 8° C за не повече от 48 часа.

ПОДГОТОВКА ЗА УПОТРЕБА

Размразете за една нощ в хладилник (2° C – 8° C), след което внимателно размесете, за да получите хомогенност. Асептично накапете 10 ml от средата в стерилни слайд-флакони за култури и еквилибрирайте до 37° C за незабавна употреба.

Забележка: Кристали калциев карбонат често се формират в CHANG Medium MF. Няма данни наличието на тези кристали да причинява неблагоприятен ефект върху функционалността на продукта.

УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

За цитогенетични изследвания се използва цяла кръв или отделени левкоцити, но последните са по-лесни и по-широко използвани в рутинни изследвания. Както при всяка процедура с култури от клетки, оптималните резултати зависят от установяване на адекватни условия за културата. Тъй като е възможно относителното съдържание на активен PHA леко да варира при различните партиди, може да е от полза тестване на две концентрации на PHA.

За допълнителни подробности относно използването на тези продукти всяка лаборатория трябва да направи справка със своите собствени лабораторни процедури и протоколи, които са конкретно разработени и оптимизирани за Вашата индивидуална медицинска програма.

I. Подготовка на проба:

За възрастни лица пригответе 5 – 10 ml прясна кръв в натриев хепарин и 2 – 3 ml за деца.

- Цялата кръв трябва да бъде транспортирана на стайна температура и смесена чрез обръщане.
- Лимфоцитите от цялата кръв могат да бъдат стимулирани с фитохемаглутинин (PHA) и могат да се култивират с техника на синхронизация.

II. Култура от цялата кръв:

Обозначете с етикет всички съдове с култури с името на пациента, номера на спесимена и типа на културата.

1. Преди инокулацията на спесимена темперирайте CHANG Medium MF до температурата на околната среда.
2. Реконституирайте PHA, като добавите 5 ml стерилна дестилирана вода с помощта на стерилна спринцовка.
3. Подгответе изискваните 5 ml CHANG Medium MF, необходими за всеки съд с култура, като използвате асептична техника.
4. Добавете 0,1 ml реконституиран PHA към всеки съд с култура.
5. Инокулирайте с 0,3 ml от пробата за всяка култура. Ако пациентът е новородено (на по-малко от 1 месец), инокулирайте с 0,2 ml от пробата.
6. Всяка отделна лаборатория трябва да определи броя култури, които да подготви, в зависимост от клиничните показания и възрастта на пациента. На спесимени от новородени (на по-малко от 1 месец) трябва да бъде стартирана допълнителна култура от 48 часа без синхронизация.
7. Инкубирайте културите при 35° C – 39° C, 5% – 8% CO_2 атмосфера, докато станат готови за събиране.
8. За синхронизация: След 48 часа инкубация добавете 50 µL работен разтвор метотрексат за всеки 5 ml култура, която ще бъде събрана на 72 часа. Добавете 100 µL работен разтвор тимидин за всеки 5 ml култура 18 – 19 часа след добавяне на метотрексат (5 – 6 часа преди събиране).

III. Събиране на културите:

1. Извадете готовата за събиране култура от инкубатора и внимателно разклатете флакона, за да ресуспендирате клетките.
2. Прехвърлете съдържанието на всеки слайд-флакон в центрофужна епруветка от 15 ml.
3. Добавете 40 µl изходен разтвор на колцемид (10 µg/ml) към всяка епруветка с култура. Затворете плътно епруветките с капачка и внимателно смесете с преобръщане.
4. Инкубирайте епруветките при 35° C – 39° C за 45 минути.
5. След инкубация центрофугирайте епруветките за 8 минути при 1000 rpm.
6. Внимателно аспирирайте супернатанта от всяка епруветка с вакуумен аспиратор с филтър за разтворител. Внимавайте да не аспирирате пелетата.
7. Ресуспендирайте пелетата, като потупате с пръст дъното или стената на всяка епруветка.
8. Настройте таймера на 20 минути.
9. Добавете на капки 3 – 4 ml от предварително затоплен (35° C – 37° C) хипотоничен разтвор (0,075 M калиев хлорид).
10. Затворете плътно епруветката с капачка и внимателно смесете, като потупате с пръст дъното или стената на епруветката.
11. Добавете на капки 5 – 6 ml от предварително затоплен (35° C – 37° C) хипотоничен разтвор. Затворете плътно епруветката с капачка и я обърнете.

12. Повторете стъпки 8 – 10 за всяка епруветка.
13. Оставете епруветките да престоят на водна баня при 35° C – 37° C. Обърнете ги веднъж, когато 20-минутният таймер стигне до половината.
14. Когато 20-минутният таймер завърши, към всяка епруветка добавете 1 ml пресен фиксиращ разтвор на Карной в съотношение 3:1. Затворете плътно всяка епруветка с капачка и я обърнете. (Това е стъпката с предварително използване на фиксиращ разтвор).
15. Центрофугирайте епруветките за 8 минути при 1000 rpm.
16. Аспирирайте супернатанта от всяка епруветка, оставяйки около 1 ml над пелетата от клетки. Внимавайте да не аспирирате пелетата. Бъдете внимателни за влакнест материал, който може да се подава извън пелетата от клетки и да достига до супернатанта след центрофугиране. Последните няколко ml супернатант може да е необходимо да се отстранят на ръка с помощта на пипета тип Пастьор (без използване на вакуумна аспирация), за да се избегне аспириране на цялата пелета от клетки в контейнера за отпадък.
17. Ресуспендирайте пелетата от клетки, както е описано в стъпка 7.
18. Добавете на капки 3 – 4 ml пресен фиксиращ разтвор на Карной в съотношение 3:1.
19. Добавете останалия фиксиращ разтвор, така че общият обем да стане до 7 ml.
20. Повторете стъпки 16 – 18 за всяка епруветка.
21. Оставете за 10 минути на стайна температура. (Това е първата стъпка с използване на фиксиращ разтвор).
22. Центрофугирайте епруветките за 8 минути при 1000 rpm.
23. Аспирирайте супернатанта, като оставите около 1 ml над пелетата от клетки. Ресуспендирайте пелетата от клетки.
24. Добавете фиксиращ разтвор до 7 ml. Центрофугирайте епруветките за 8 минути при 1000 rpm. (Втора стъпка с използване на фиксиращ разтвор).
25. Повторете стъпки 23 – 24. (Трета стъпка с използване на фиксиращ разтвор).
26. На този етап фиксираните пелети от клетки могат да се използват незабавно за приготвяне на слайд съгласно стандартния протокол на лабораторията или да се съхранят в хладилник (2° C – 8° C) или камера за бъдеща употреба.

КЛИНИЧНИ ПРИЛОЖЕНИЯ

Модалният брой човешки хромозоми е 46. Човешките хромозоми са класифицирани съгласно дължината си и позицията на центромера (класификация Денвър). Аберации на хромозомна конституция са свързани с множество вродени нарушения, например синдром на Даун (обикновено с допълнителна малка автозома) и синдроми, свързани с неопределена сексуалност (синдром на Търнър, синдром на Клайнфелтер и други, при които половите хромозоми са абнормни). Придобита хромозомна абнормност може да бъде открита в пропорция на левкоцитите при хронична миелоидна левкемия (хромозома „Филаделфия“) и напредъкът на лечението може да бъде оценен чрез проследяване на този маркер. При наближаване на границата на поносимост при лъчева терапия има забележимо повишаване в пропорцията на клетките със странна хромозомна конституция и появата на тези клетки се използва за ориентир при дозирането.

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ

Съхранявайте CHANG Medium MF замразена при температура под -10° C до момента на използването й. CHANG Medium MF е стабилна до изтичане на срока на годност, посочен върху етикета на бутилката, когато се съхранява замразена. След размразяване количеството неизползван продукт може да бъде разпределено в работни аликвотни части и замразено отново (максимум два пъти) за употреба на по-късен етап или да бъде плътно затворено с капачка и съхранено при температура от 2° C до 8° C за до 30 дни. Пазете от флуоресцентна светлина.

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Това изделие е предназначено да се използва от персонал, обучен в процедурите, които включват планираното приложение, за което изделието е предназначено.

CHANG Medium MF съдържа FBS (фетален говежди серум) и с нея трябва да се борави съгласно универсалните лабораторни предпазни мерки. Средата съдържа антибиотик (гентамицин сулфат) за намаляване на риска от бактериална контаминация, но трябва винаги да се използват асептични методи при разпределяне на средата. Не използвайте среда, която не е червена на цвят.

HRVATSKI

INDIKACIJE ZA UPOTREBU

CHANG Medium MF medij je spreman za upotrebu, bez mitogena, za uzgoj kulture periferne krvi i drugih uzoraka u svrhe citogenetičke analize.

OPIS PROIZVODA

CHANG Medium MF sastoji se od medija RPMI koji sadržava 20 % FBS-a, 2 mmol/l glutamina, 20 mmol/l pufera HEPES i antibiotika gentamicinsulfat. Možda će trebati dodati mitogeno sredstvo kao što je fitohemaglutinin (PHA) kako bi se optimirao rast stanica periferne krvi i drugih stanica. Svaki laboratorij mora utvrditi potrebnu koncentraciju PHA-a (ili drugih mitogena).

KOMPONENTE

Aminokiselina

Arginin
Asparagin
Aspartatna kiselina
Cistin
Glutamatna kiselina
Glutamin
Glicin
Histidin
Izoleucin
Leucin
Lizin
Metionin
Fenilalanin
Prolin
Serin
Treonin
Triptofan
Tirozin
Valin

Voda

Kvaliteta u skladu s propisanom za vodu za injekcije

Proteini, hormoni i čimbenici rasta

Fetalni goveđi serum (FBS)

pH indikator

Fenol crveno

Ostalo

Biotin
Hidroksiprolin
Glutation

Puferi

Natrijev hidrogenkarbonat
HEPES

Energetski supstrati

Glukoza
Inozitol

Soli i ioni

Natrijev klorid
Kolinijev klorid
Kalcijev nitrat
Kalijev klorid
Magnezijev sulfat
Natrijev fosfat

Antibiotik

Gentamicinsulfat

Vitamini i elementi u tragovima

Folna kiselina
Nikotinamid
Riboflavin
Tijamin
Pantotenska kiselina
Kobalamin
Piridoksin
Aminobenzoatna kiselina

OSIGURANJE KVALITETE

STERILNOST

Serum koji se koristi za proizvodnju medija CHANG Medium MF testiran je na kontaminaciju virusima u skladu sa Zakonikom saveznih propisa SAD-a (CFR), Glava 9., dio 113.53. Uz to, testiran je i na kontaminaciju mikoplazmom. CHANG Medium MF steriliziran je filtracijom kroz filtar od 0,1 mikron. Uzorci medija CHANG Medium MF testirani su na moguću bakteriološku kontaminaciju nakon provedbe protokola testiranja sterilnosti koji je opisan u važećem testu sterilnosti u skladu s Farmakopejom Sjedinjenih Američkih Država, USP <71>.

Više čimbenika – uključujući izvor uzorka, 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.

Mitotski indeks, duljina kromosoma i kvaliteta svake proizvodne serije medija CHANG Medium MF procjenjuju se upotrebom periferne krvi i uspoređuju se s kontrolnim medijem. Rezultati su navedeni na Potvrdi o analizi svake proizvodne serije.

POTREBNI MATERIJALI I OPREMA KOJI NISU PRILOŽENI

1. Sterilna otopina fitohemaglutinina (PHA) (9 mg/ml)
2. Heparin koji ne sadrži fenol
3. Otopina kolcemida 25 µg/ml
4. Otopina kalijevog klorida 75 mmol/l
5. Acetatni alkohol, 1 dio ledene octene kiseline: 3 dijela metanola (odgovarajuće kvalitete za analitički reagens)
6. Giemsa ili 2 % octena kiselina – orcein
7. Kromna kiselina
8. Sredstvo za uklapanje uzoraka
9. Predmetna i pokrovna stakalca
10. Plastične epruvete za centrifugu
11. CO_2 inkubator
12. Stolna centrifuga
13. Vrtložna miješalica
14. Svjetlosni mikroskop

PRIKUPLJANJE UZORAKA I RUKOVANJE UZORCIMA

Razina limfocita s normalnom funkcijom u trenutku uzorkovanja utječe na uspješnost uzgoja kultura pune krvi za citogenetičku analizu. S obzirom na to da na tu razinu mogu utjecati infekcije i lijekovi, ispitanici koji se podvrgavaju citogenetičkom ispitivanju moraju se, kadgod je to moguće, suzdržati od uzimanja lijekova 7 dana prije prikupljanja krvi za pretrage. Slično tome, mitotski indeks može biti znatno smanjen tijekom anergičnih faza nekih bolesti (npr. Hodgkinove bolesti, sarkoidoze itd.) i, u manjoj mjeri, u normalnih pojedinaca tijekom kasnijih stadija trudnoće. U uzorke krvi za kulturu limfocita ne smije se dodavati konzervans. Nužno je primjenjivati aseptičke metode.

Pretrage na uzorcima krvi moraju se obaviti bez odlaganja, kadgod je to moguće. Ako je to apsolutno nužno, uzorci se mogu čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C najduže 48 sati.

PRIPREMA ZA UPOTREBU

Odmrznite preko noći u hladnjaku (2 – 8 °C), zatim nježno 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.

Napomena: uobičajeno je da se u mediju CHANG Medium MF formiraju kristali kalcijeva karbonata. Nije zabilježeno da prisutnost tih kristala ima ikakvo štetno djelovanje na performanse proizvoda.

UPUTE ZA UPOTREBU

Za citogenetička ispitivanja upotrebljavani su uzorci pune krvi ili odvojenih leukocita, no rad s uzorcima pune krvi najjednostavniji je i najčešće primjenjivan u rutinskim ispitivanjima. Kao što je slučaj sa svim postupcima uzgoja kulture stanica, optimalni rezultati ovise o uspostavljanju odgovarajućih uvjeta za uzgoj kulture. S obzirom na to da relativan udio djelatne PHA-e može blago varirati među različitim proizvodnim serijama, moglo bi biti korisno testirati dvije koncentracije PHA-e.

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.

I. Priprema uzorka:

Za odrasle pacijente nabavite 5 – 10 ml svježe krvi u natrijevu heparinu, a za pedijatrijske pacijente 2 – 3 ml.

- Punu krv treba transportirati pri sobnoj temperaturi i miješati prevrtanjem.
- Limfociti iz pune krvi mogu se potaknuti fitohemaglutininom (PHA) i mogu se kultivirati tehnikom sinkronizacije.

II. Kultura pune krvi:

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

1. Prije inokulacije uzorka, dovedite CHANG Medium MF na sobnu temperaturu.
2. Rekonstituirati PHA dodajući 5 ml sterilne destilirane vode sterilnom štrcaljkom.
3. Aseptički pripremiti potrebnih 5 ml medija CHANG Medium MF potrebnog za svaku posudu s kulturom.
4. Dodati 0,1 ml rekonstituiranog PHA po posudi s kulturom.
5. Inokulirati 0,3 ml uzorka po kulturi. Ako je pacijent novorođenče (<1 mjeseca), inokulirajte 0,2 ml uzorka.
6. Svaki laboratorij mora utvrditi broj kultura koje mora pripremiti ovisno o kliničkim indikacijama i dobi pacijenta. Dodatna 48-satna kultura treba se inicirati na uzorcima novorođenčadi (<1 mjeseca) bez sinkronizacije.
7. Inkubirati kulture pri 35 – 39 °C, u atmosferi od 5 – 8 % CO_2 dok ne budu spremne za prikupljanje.
8. Za sinkronizaciju: Nakon 48 sati inkubacije dodajte 50 µl radne otopine metotreksata na svakih 5 ml kulture koja će se prikupljati u roku od 72 sata. Dodajte 100 µl radne otopine timidina na 5 ml svake kulture 18 –19 sati nakon dodavanja metotreksata (5 – 6 sati prije prikupljanja).

III. Prikupljanje kultura:

1. Ukloniti kulturu spremnu za prikupljanje iz inkubatora i lagano zavrtiti tikvicu da bi se obnovila suspenzija stanica.
2. Prenijeti sadržaj svake tikvice u epruvetu od 15 ml za centrifugu.
3. U svaku epruvetu kulture dodati 40 µl temeljne standardne otopine kolcemida (10 µg/ml). Čvrsto začepiti epruvete i miješati prevrtanjem.
4. Inkubirati epruvete 45 minuta pri 35 – 39 °C.
5. Nakon inkubacije centrifugirati epruvete 8 minuta na 1.000 o/min.
6. Pažljivo aspirirati supernatant iz svake epruvete s pomoću vakuumskog aspiratora proizvodom za ekstrakciju otapala. Pripazite da ne aspirirate talog.
7. Obnoviti suspenziju taloga tapkanjem prstom po dnu ili sa strana svake epruvete.
8. Pokrenite 20-minutni brojač vremena.
9. Dodati kap po kap 3 – 4 ml prethodno zagrijane (35 – 37 °C) hipotonične otopine (0,075 mol/l kalijev klorid).
10. Čvrsto začepiti epruvetu i lagano promiješati tapkanjem prstom po dnu ili sa strana epruvete.
11. Dodati kap po kap 5 – 6 ml prethodno zagrijane (35 – 37 °C) hipotonične otopine. Čvrsto začepiti i prevrnuti epruvetu.
12. Ponoviti 8. – 10. korak za svaku epruvetu.
13. Pustiti da epruvete odstoje u vodenoj kupelji na 35 – 37 °C. Prevrnuti epruvete jedanput na polovici vremena 20-minutnog brojača.
14. Dodati 1 ml svježeg 3:1 Carnoyevog fiksativa u svaku epruvetu, po isteku vremena 20-minutnog brojača. Čvrsto začepiti i prevrnuti svaku epruvetu. (ovo je korak prije fiksativa)
15. Centrifugirati epruvete 8 minuta na 1.000 o/min.

16. 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.
17. Obnoviti suspenziju taloga stanica kako je opisano u 7. koraku.
18. Dodati kap po kap 3 – 4 ml svježeg 3:1 Carnoyevog fiksativa.
19. Dodati preostali fiksativ do 7 ml.
20. Ponoviti 16. – 18. korak za svaku epruvetu.
21. Neka odstoji 10 minuta pri sobnoj temperaturi. (ovo je prvi korak fiksativa)
22. Centrifugirati epruvete 8 minuta na 1.000 o/min.
23. Aspirirati supernatant i ostaviti otprilike 1 ml iznad taloga. Obnoviti suspenziju taloga stanica.
24. Dodati fiksativ do 7 ml. Centrifugirati epruvete 8 minuta na 1.000 o/min. (drugi korak fiksativa)
25. Ponoviti 23. – 24. korak (treći korak fiksativa).
26. 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.

KLINIČKE PRIMJENE

Modalni broj kromosoma u čovjeka jest 46. Ljudski kromosomi klasificirani su prema svojoj dužini i položaju centromere (denverska klasifikacija). Aberacije kromosomske strukture povezane su s više urođenih poremećaja kao što su Downov sindrom (uglavnom s dodatnim malim autosomom) i sindromi povezani s neodređenom spolnošću (Turnerov sindrom, Klinefelterov sindrom i drugi u kojima se javljaju abnormalnosti spolnih kromosoma). Uslijed kronične mijeloične leukemije u dijelu leukocita moguće je utvrditi stečenu kromosomsku abnormalnost (kromosom Philadelphia) i praćenjem tog biljega moguće je procijeniti napredovanje liječenja. Kako se bolesnik približava granici podnošljivosti radioterapije, dolazi do znatnog porasta udjela stanica s neobičnim kromosomskim strukturama, a pojava tih stanica može služiti kao smjernica za doziranje.

POHRANA I STABILNOST

Medij CHANG Medium MF čuvati zamrznut, na temperaturi manjoj od -10 °C dok ga se ne bude trebalo upotrijebiti. Medij CHANG Medium MF 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 (najviše dva puta) za kasniju upotrebu ili ga se može čvrsto začepiti i čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C najviše 30 dana. Zaštititi 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 Medium MF sadrži FBS 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 GĦALL-UŻU

CHANG Medium MF huwa midjum mingħajr mitoġeni li hu lest biex jintuża għall-użu fit-tkabbir ta' demm periferali u kampjuni oħra għall-għanijiet ta' analiżi ċitoġenika.

DESKRIZZJONI TAL-APPARAT

CHANG Medium MF jikkonsisti minn RPMI li fih 20% FBS, 2 mM glutamine, 20 mM HEPES bafer u l-antibijotiku Gentamicin Sulfate. Jista' jkun jeħtieġ iż-żieda ta' aġenti mitoġeniċi, bħal phytohemagglutinin (PHA) sabiex jiġi ottimizzat it-tkabbir ta' demm periferali u ċelloli oħra. Il-konċentrazzjoni meħtieġa ta' PHA (jew mitoġeni oħra) għandha tiġi ddeterminata mil-laboratorju individwali.

KOMPONENTI

Aċidi Amminiċi

Arginine
Asparagine
Aspartic Acid
Cystine
Glutamic Acid
Glutamine
Glycine
Histidine
Isoleucine
Leucine
Lysine
Methionine
Phenylalanine
Proline
Serine
Threonine
Tryptophan
Tyrosine
Valine

Ilma

Kwalità tal-WFI (Ilma għall-Injezzjonijiet)

Proteini, Ormoni u Fatturi ta' Tkabbir

Fetal bovine serum (FBS)

Indikatur tal-pH

Phenol Red

Oħrajn

Biotin
Hydroxyproline
Glutathione

Bafers

Sodium bicarbonate
HEPES

Substrati tal-Enerġija

Glucose
Inositol

Imluħa u Joni

Sodium chloride
Choline chloride
Calcium nitrate
Potassium chloride
Magnesium sulfate
Sodium phosphate

Antibijotiku

Gentamicin Sulfate

Vitamini u mikroelementi

Folic acid
Nicotinamide
Riboflavin
Thiamine
Pantothenic acid
Cobalamin
Pyridoxine
Aminobenzoic acid

ASSIGURAZZJONI TAL-KWALITÀ

STERILITÀ

Serum użat fil-produzzjoni ta' CHANG Medium MF ġie ttestjat għall-kontaminazzjoni minn viruses skont CFR Titolu 9 Taqsima 113.53. Ġie skrinjat ukoll għall-kontaminazzjoni minn mikoplażma. CHANG Medium MF jiġi sterilizzat permezz ta' filtrazzjoni minn ġo filtru ta' daqs 0.1 mikron. Kampjuni ta' CHANG Medium MF jiġu ttestjati għall-possibbiltà ta' kontaminazzjoni batterjoloġika skont il-protokoll ta' ttestjar għall-isterilità deskritt fit-test attwali tal-USP għall-Isterilità <71>.

Bosta fatturi inklużi is-sors tal-kampjuni, il-kundizzjonijet tat-tkabbir u l-għażla tar-reaġenti jistgħu jinfluwenzaw ir-riżultat miksub. L-utenti jingħataw il-parir li jħaddmu kull ammont ġdid tar-reaġent b'mod parallel mal-materjal ta' referenza b'attività xierqa magħrufa qabel ma jibda jintuża b'mod regolari.

Kull Lott ta' CHANG Medium MF jiġi vvalutat bl-użu ta' demm periferali għall-indiċi mitotiku, it-tul u l-kwalità tal-kromożomi meta mqabbla ma' midjum ta' kontroll. Ir-riżultati jiġu rrappurtati fuq Ċertifikat ta' Analizi speċifiku.

MATERJALI U TAGĦMIR MEĦTIEĠ IŻDA MHUX IPPROVDUT

1. Soluzzjoni ta' Phytohemagglutinin (PHA) (9 mg/mL), Sterili
2. Phenol-Free Heparin
3. Soluzzjoni ta' Colcemid 25 µg/mL
4. Soluzzjoni ta' Potassium Chloride, 75 mM
5. Acetic Alcohol, 1 part Glacial Acetic Acid: 3 partijiet Methanol (Grad ta' Reaġent Analitiku)
6. Giemsa jew 2% Acetic Acid-orcein
7. Chromic acid
8. Mezz ta' muntatura
9. Slajds tal-ħġieġ u Kopertini
10. Tubi tal-Plastik taċ-Ċentrifugu
11. Inkubatur ta' CO_2
12. Ċentrifugu ta' fuq il-Bank
13. Vortex Mixer
14. Mikroskopju tad-Dawl

II-ĠBIR TAL-KAMPJUNI U L-IMMANIĠĠJAR

Is-suċċess tal-koltori ta' demm sħiħ għall-analiżi ċitoġenetika jiġi influwenzat mil-livell ta' limfoċiti b'funzjoni normali fil-ħin tat-teħid tal-kampjuni. Minħabba li dan il-livell jista' jiġi affetwat minn infezzjonijiet u mediċini, fejn hu possibbli l-pazjenti għall-istudji ċitoġenetiċi m'għandhom ikunu ħadu l-ebda mediċina matul is-7 ijiem ta' qabel il-ġbir tad-demm għat-testijiet. Bl-istess mod, jista' jkun hemm tnaqqis kbir fl-indiċi mitotiku matul il-fażijiet anerġiċi ta' ċertu mard (pereżempju l-marda ta' Hodgkin, sarkojdożi, eċċ.) u, fuq skala iżgħar, f'individwi normali matul l-aħħar stadji tat-tqala. M'għanduz jiżdied preżervattiv lill-kampjuni tad-demm għat-tkabbir tal-limfoċiti. Tekniċi asettiċi huma essenzjali.

Il-kampjuni tad-demm għandhom jiġu ttestjati mingħajr dewmien fejn hu possibbli. Jekk assolutament meħtieġ, jistgħu jinħażnu f'temperatura ta' bejn 2°C sa 8°C għal mhux iktar minn 48 siegħa.

PREPARAZZJONI GĦALL-UŻU

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

Nota: Kristalli ta' calcium carbonate ta' spiss jifformaw f'CHANG Medium MF. Il-preżenza ta' dawn il-kristalli ma jidhirx li tikkawża xi effett detrimentali fuq il-prestazzjoni tal-prodott.

ISTRUZZJONIJIET DWAR L-UŻU

Demm sħiħ jew lewkoċiti separati t-tnejn intużaw għal studji ċitoġenetiċi, iżda tal-ewwel huwa l-iktar sempliċi u l-iktar li ntuża fi studji ta' rutina. Bħal fi kwalunkwe proċedura ta' tkabbir ta' ċelloli, il-kisba tal-aħjar riżultati tiddependi fuq it-twaqqif ta' kundizzjonijiet adegwati għat-tkabbir. Minħabba li l-kontenut relattiv ta' PHA attiv jista' jvarja ftit bejn lottijiet differenti, jista' jkun ta' benefiċċju jekk jiġu ttestjati żewġ konċentrazzjonijiet ta' PHA.

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

I. Preparazzjoni tal-Kampjun:

Ikseb 5-10 mL ta' demm frisk f'sodium heparin għall-adulti, u 2-3 mL għat-tfal.

- Id-demm sħiħ għandu jasal f'temperatura ambjentali u jiġi mħallat billi taqilbu rasu 'l isfel.
- Limfoċiti mid-demm sħiħ jistgħu jiġu stimulati b'Phytohemagglutinin (PHA) u jistgħu jiġu kkultivati b'teknika ta' sinkronizzazzjoni.

II. Koltura ta' Demm Sħiħ:

Agħmel tikketta bl-isem tal-pazjent, in-numru tal-kampjun, u t-tip ta' koltura fuq il-kontenituri tal-kolturi kollha.

1. Qabel l-inokulazzjoni tal-kampjun, ġib iċ-CHANG Medium MF għal temperatura ambjentali.
2. Irrikostitwixxi l-PHA billi żżid 5 mL ta' ilma sterili distillat, bl-użu ta' siringa sterili.
3. Ipprepara l-5 mL ta' CHANG Medium MF meħtieġa għal kull kontenitur tal-kolturi, bl-użu ta' teknika asettika.
4. Żid 0.1 mL ta' PHA rikostitwit għal kull kontenitur tal-kolturi.
5. Agħmel inokulazzjoni ta' 0.3 mL tal-kampjun għal kull koltura. Jekk il-pazjent ikun tarbija (età < xahar 1), agħmel inokulazzjoni b'0.2 mL tal-kampjun.
6. Kull laboratorju individwali għandu jiddetermina n-numru ta' kolturi li għandu jipprepara skont l-indikazzjoni klinika u l-età tal-pazjent. Għandha tinbeda koltura addizzjonali ta' 48 siegħa fuq kampjuni minn trabi tat-twelid (età <xahar 1) mingħajr sinkronizzazzjoni.
7. Inkuba l-kolturi f'temperatura ta' 35 - 39°C, f'atmosfera ta' 5 - 8% CO_2 sakemm ikunu lesti għall-ħsad.
8. Għas-sinkronizzazzjoni: Wara 48 siegħa ta' inkubazzjoni żid 50µL ta' soluzzjoni utilizzabbli ta' Methotrexate ma' kull koltura ta' 5 mL biex tinħasad wara li jgħaddu 72 siegħa. Żid 100 µL ta' soluzzjoni utilizzabbli ta' Thymidine ma' kull koltura ta' 5 mL, 18 sa 19-il siegħa wara ż-żieda ta' Methotrexate (5 - 6 sigħat qabel il-ħsad).

III. Il-Ħsad tal-Kolturi:

1. Neħħi l-koltura lesta għall-ħsad mill-inkubatur u dawwar il-flask bil-mod biex tissospendi ċ-ċelloli mill-ġdid.
2. Ittrasferixxi l-kontenut ta' kull flask għal tubu ċentrifugu ta' 15 mL.
3. Żid 40 µL tas-soluzzjoni ewlenija ta' Colcemid (10 µg/mL) f'kull tubu tal-koltura. Agħlaq it-tubi b'mod sikur u ħawwad billi taqlibhom 'l isfel bil-mod.
4. Inkuba t-tubi f'temperatura ta' 35 - 39°C għal 45 minuta.
5. Wara l-inkubazzjoni, iċċentrifuga t-tubi għal 8 minuti fuq 1,000 rpm.
6. Bir-reqqa aspira s-supernatant minn kull tubu bl-użu ta' aspirazzjoni b'vakum, bl-ilqugħ għas-solvent. Oqgħod attent li ma taspirax il-gerbuba.
7. Erġa' ssospendi l-gerbuba billi tagħti daqqa ħafifa b'subgħajk lill-qiegħ jew il-ġenb ta' kull tubu.
8. Issettja l-kronometru fuq 20 minuta.
9. Qatra qatra, żid 3 - 4 mL ta' soluzzjoni ipotonika (0.075M Potassium Chloride) imsaħħna minn qabel (35 - 37°C).
10. Agħlaq it-tubu b'mod sikur u ħawwad bil-mod billi tagħti daqqa ħafifa b'subgħajk lill-qiegħ jew il-ġenb tat-tubu.
11. Qatra qatra, żid 5 - 6 mL ta' soluzzjoni ipotonika msaħħna minn qabel (35 - 37°C). Agħlaq it-tubu b'mod sikur u aqleb it-tubu 'l isfel.
12. Irrepeti l-Punti 8 -10 għal kull tubu.
13. Bl-użu ta' banju bl-ilma, ħalli t-tubi joqogħdu f'temperatura ta' 35 - 37°C. Aqleb it-tubi 'l isfel darba meta l-kronometru jasal f'nofs l-20 minuta.
14. Żid 1 mL ta' 3:1 Carnoy's Fixative frisk ma' kull tubu, fi tmiem l-20 minuta fuq il-kronometru. Agħlaq it-tubu b'mod sikur u aqleb kull tubu 'l isfel. (Dan huwa l-pass ta' Qabel il-Fissattiv).

15. Iċċentrifuga t-tubi għal 8 minuti fuq 1,000 rpm.
16. Aspira s-supernatant minn kull tubu waqt li tħalli madwar 1 mL fuq kull gerbuba ta' ċelloli. Oqgħod attent li ma taspirax il-gerbuba. Oqgħod attent għall-materjal fibruż li jista' jestendi mill-gerbuba taċ-ċelloli 'l fuq għal ġos-supernatant wara ċ-ċentrifugazzjoni. Jista' jkun li l-aħħar ftit mL tas-supernatant ikollhom jitneħħew 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.
17. Erġa' ssospendi l-gerbuba taċ-ċelloli kif deskritt fil-Punt 7.
18. Qatra qatra, żid 3 - 4 mL ta' 3:1 Carnoy's Fixative frisk.
19. Żid il-fissattiv li jibqa' sabiex il-volum totali fit-tubu jkun ta' 7 mL.
20. Irrepeti l-punti 16 - 18 għal kull tubu.
21. Ħallihom joqogħdu għal 10 minuti f'temperatura ambjentali. (Dan huwa l-Ewwel pass fissattiv).
22. Iċċentrifuga t-tubi għal 8 minuti fuq 1,000 rpm.
23. Aspira s-supernatant u ħalli madwar 1 mL fuq il-gerbuba. Erġa' ssospendi l-gerbuba taċ-ċelloli.
24. Żid il-fissattiv sa 7 mL. Iċċentrifuga t-tubi għal 8 minuti fuq 1,000 rpm. (It-tieni pass fissattiv).
25. Irrepeti l-punti 23 - 24. (It-tielet pass fissattiv).
26. F'dan il-punt, il-gerbubi taċ-ċelloli ffissati jistgħu jintużaw immedjatament għall-preparazzjoni tal-islajds skont il-protokoll standard tal-laboratorju jew jinħażnu fil-friġġ (2 - 8°C) jew fil-friża għall-użu fil-futur.

APPLIKAZZJONIJIET KLINIĊI

In-numru modali tal-kromożomi umani huwa 46. Il-kromożomi umani ġew ikklassifikati skont it-tul tagħhom u l-pożizzjoni taċ-ċentromeru (Klassifikazzjoni Denver). Aberrazzjonijiet fil-kostituzzjoni tal-kromożomi ġew assoċjati ma' għadd ta' disturbi konġenitali bħas-sindrome Down (tipikament b'awtożoma żgħira addizzjonali) u sindromi assoċjati ma' sesswalità indeterminata (sindrome ta' Turner, sindrome ta' Klinefelter u oħrajn, fejn il-kromożomi sesswali jkunu abnormali). Abnormalità akkwiżita fil-kromożomi tista' tinstab fi proporzjon tal-lewkoċiti f'lewkimja mijeloċitika kronika (il-kromożoma "Philadelphia") u l-progress tat-trattament jista' jiġi vvalutat bil-monitoraġġ ta' dan il-markatur. Hekk kif il-limitu ta' tolleranza jkun se jintlaħaq fit-terapija bir-radjazzjoni, ikun hemm żieda notevoli fil-proporzjon ta' ċelloli b'kostituzzjoni tal-kromożomi stramba u d-dehra ta' dawn iċ-ċelloli ntużat bħala gwida tad-dosaġġ.

ĦAŻNA U STABBILTÀ

Aħżen CHANG Medium MF iffriżat, f'temperatura inqas minn -10°C, sakemm ikun lest biex jintuża. CHANG Medium MF huwa stabbli sad-data ta' skadenza li tidher fuq it-tikketta tal-flixkun meta maħżun iffriżat. Wara li jinħall, jekk jibqa' xi ammont ta' prodott li ma ntużax, dan jista' jiġi ddispensat f'alikwoti utilizzabbli u ffriżat mill-ġdid (mhux iktar minn darbtejn) għall-użu fil-futur, jew jingħalaq sew u jinħażen f'temperatura ta' 2-8°C għal mhux iktar minn 30 jum. Ipproteġi minn dawl fluworexxenti.

PREKAWZJONIJIET U TWISSIJIET

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

CHANG Medium MF fih FBS u għandu jiġi mmaniġġjat bil-prekawzjonijiet universali tal-laboratorju. Dan il-midjum fih antibijotiku (gentamicin sulfate) sabiex jitnaqqas il-potenzjal għall-kontaminazzjoni mill-batterji, iżda dejjem għandhom jintużaw tekniċi asettiċi meta jiġi ddispensat dan il-midjum. M'għandek tuża l-ebda midjum li mhuwiex ta' kulur ħamrani.

SLOVENŠČINA

INDIKACIJE ZA UPORABO

Medij CHANG Medium MF je brez mitogenov in za uporabo pripravljen medij za gojenje periferne krvi in drugih vzorcev za namene citogenske analize.

OPIS PRIPOMOČKA

CHANG Medium MF je sestavljen iz medija RPMI z 20 % FBS, 2 mM glutamina, 20 mM pufra HEPES in antibiotika gentamicinijev sulfat. Mediju bo morda treba dodati mitogene učinkovine, kot je fitohemaglutinin (PHA), za optimizacijo rasti periferne krvi in drugih celic. Potrebno koncentracijo PHA (ali drugih mitogenih učinkovin) je treba določiti v posameznem laboratoriju.

KOMPONENTE

Aminokisline

Arginin
Asparagin
Asparaginska kislina
Cistin
Glutaminska kislina
Glutamin
Glicin
Histidin
Izolevcin
Levcin
Lizin
Metionin
Fenilalanin
Prolin
Serin
Treonin
Triptofan
Tirozin
Valin

Voda

Kakovost, ki ustreza vodi za injekcije

Beljakovine, hormoni in rastni faktorji

Serum govejega zarodka (FBS)

Indikator vrednosti pH

Fenol rdeče

Drugo

Biotin
Hidroksiprolin
Glutation

Pufri

Natrijev bikarbonat
HEPES

Energijski substrati

Glukoza
Inozitol

Soli in ioni

Natrijev klorid
Holinklorid
Kalcijev nitrat
Kalijev klorid
Magnezijev sulfat
Natrijev fosfat

Antibiotik

Gentamicinijev sulfat

Vitamini in elementi v sledovih

Folna kislina
Nikotinamid
Riboflavin
Tiamin
Pantotenska kislina
Kobalamin
Piridoksin
Aminobenzojska kislina

ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI

STERILNOST

Serum, uporabljen pri proizvodnji medija CHANG Medium MF, je testiran za virusno kontaminacijo po standardu CFR, naslov 9, del 113.53. Testiran je tudi glede mikoplazemske kontaminacije. CHANG Medium MF je steriliziran s filtracijo skozi 0,1-mikronski filter. Vzorci medija CHANG Medium MF so testirani za morebitno bakteriološko kontaminacijo po protokolu za testiranje sterilnosti, opisanem v trenutni USP za testiranje sterilnosti <71>.

Na dobljeni rezultat lahko vpliva več dejavnikov, vključno z virom vzorca, 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.

Vsaka serija medija CHANG Medium MF je ocenjena z uporabo periferne krvi glede mitotskega indeksa, dolžine kromosomov in kakovosti v primerjavi s kontrolnim medijem. Rezultati so navedeni na analiznem certifikatu za vsako serijo.

POTREBNI MATERIALI IN PRIPOMOČKI, KI NISO PRILOŽENI

1. Raztopina fitohemaglutinina (PHA) (9 mg/ml), sterilna
2. Heparin brez fenola
3. Raztopina kolcemida, 25 µg/ml
4. Raztopina kalijevega klorida, 75 mM
5. Ocetni alkohol, 1 del ledocetne kisline : 3 deli metanola (analitske kakovosti)
6. Giemsa ali 2-odstotna mešanica orceina in ocetne kisline
7. Kromova kislina
8. Medij za pritrditev mikroskopskih preparatov
9. Objektna in krovna stekelca
10. Plastične centrifugirne epruvete
11. Inkubator CO_2
12. Namizna centrifuga
13. Vrtinčni mešalnik
14. Svetlobni mikroskop

ODVZEM VZORCEV IN RAVNANJE Z NJIMI

Na uspeh kultur polne krvi za citogensko analizo vpliva raven normalno delujočih limfocitov v času vzorčenja. Ker je ta raven odvisna tudi od okužb in zdravil, naj darovalci vzorcev za citogenske študije ne jemljejo zdravil 7 dni pred odvzemom krvi za testiranje, kadar je to mogoče. Podobno se lahko mitotski indeks močno zniža v anergičnih fazah nekaterih bolezni (npr. Hodgkinove bolezni, sarkoidoze itd.) in v manjši meri tudi pri normalnih posameznicah v poznejših fazah nosečnosti. Vzorcem krvi za limfocitno kulturo se ne sme dodati konzervans. Uporaba aseptičnih tehnik je ključna.

Vzorce krvi je treba testirati takoj, ko je mogoče. Če je nujno potrebno, se lahko shranijo pri temperaturi med 2 in 8 °C, vendar za največ 48 ur.

PRIPRAVA ZA UPORABO

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

Opomba: V mediju CHANG Medium MF pogosto nastanejo kristali kalcijevega karbonata, vendar prisotnost teh kristalov ni pokazala nobenih škodljivih učinkov na uporabnost izdelka.

NAVODILA ZA UPORABO

Za citogenske študije so uporabili polno kri ali ločene levkocite, vendar je prva možnost najpreprostejša in najpogostejša v rutinskih študijah. Kot pri vseh postopkih s celičnimi kulturami so optimalni rezultati odvisni od vzpostavitve ustreznih pogojev za gojenje. Ker se relativna vsebnost aktivnega fitohemaglutinina (PHA) lahko nekoliko razlikuje med različnimi serijami, je lahko koristno testiranje dveh koncentracij PHA.

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.

I. Priprava vzorcev:

Za odrasle pridobite 5–10 ml sveže krvi v natrijevem heparinu, za otroke pa 2–3 ml.

- Polno kri je treba transportirati pri sobni temperaturi in zmešati z inverzijo.
- Limfocite iz polne krvi lahko stimulirate s fitohemaglutininom (PHA) in kultivirate s tehniko sinhronizacije.

II. Kultura polne krvi:

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

1. Pred inokulacijo vzorca ogrejte medij CHANG Medium MF na okoliško temperaturo.
2. PHA rekonstituirajte tako, da mu s sterilno brizgo dodate 5 ml sterilne destilirane vode.
3. Pripravite 5 ml medija CHANG Medium MF, ki je potreben za vsako posodo za gojenje kulture, pri tem pa uporabite aseptično tehniko.
4. Dodajte 0,1 ml rekonstituiranega PHA na posodo za gojenje kulture.
5. Inokulirajte 0,3 ml vzorca na kulturo. Če je bolnik dojenček (starost < 1 mesec), inokulirajte 0,2 ml vzorca.
6. Število kultur, ki jih je treba pripraviti glede na bolnikovo klinično indikacijo in starost bolnika, se določi v vsakem posameznem laboratoriju. Pri vzorcih novorojenčkov (starost < 1 mesec) je treba začeti z gojenjem dodatne 48-urne kulture brez sinhronizacije.
7. Kulture inkubirajte pri 35–39 °C v atmosferi s 5–8 % CO_2, dokler ne bodo pripravljene za spravljanje.
8. Za sinhronizacijo: Po 48 urah inkubacije dodajte 50 µl delovne raztopine metotreksata v vsako 5-mililitrsko kulturo, ki jo boste spravili po 72 urah. Dodajte 100 µl delovne raztopine timidina v vsako 5-mililitrsko kulturo, 18–19 ur po dodatku metotreksata (5–6 ur pred spravljanjem).

III. Pobiranje kultur:

1. Kulturo, ki je pripravljena za spravljanje, odstranite iz inkubatorja in jo nežno vrtinčite, da ponovno suspendirate celice.
2. Vsebino 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 vsebino 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 topil. Pazite, da ne boste aspirirali usedline.
7. 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 8–10.
13. Z vodno kopeljo pustite epruvete stati pri 35–37 °C. Epruvete obrnite enkrat na sredini 20 minut časovnika.
14. Po končanih 20 minutah časovnika dodajte v vsako epruveto 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. Zadnjih 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 16–18.
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 23 do 24. (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.

KLINIČNE APLIKACIJE

Modalno število humanih kromosomov je 46. Humani kromosomi so razvrščeni glede na dolžino in položaj centromere (Denverska razvrstitev). Aberacije v zgradbi kromosomov so povezane s številnimi prirojenimi motnjami, kot so Downov sindrom (običajno z dodatnim majhnim avtosomom) in sindromi, povezani z nedoločljivim spolom (Turnerjev sindrom, Klinefelterjev sindrom in drugi sindromi z anomalijami spolnih kromosomov). Pridobljeno kromosomsko anomalijo je mogoče odkriti v deležu levkocitov pri kronični mieloični levkemiji (»filadelfijski« kromosom); s preverjanjem tega označevalca se lahko oceni tudi napredovanje zdravljenja. Ko se zdravljenje z obsevanjem približuje tolerančni meji, pride do izrazitega povečanja deleža celic z nenavadno zgradbo kromosomov in videz teh celic se uporablja kot vodilo pri odmerjanju.

SHRANJEVANJE IN STABILNOST

Medij CHANG Medium MF je treba shranjevati zamrznjen pri temperaturi pod –10 °C, dokler ni pripravljen za uporabo. Če se medij CHANG Medium MF shranjuje zamrznjen, je stabilen do datuma izteka uporabnosti, ki je naveden na nalepki steklenice. Odtaljen izdelek, ki ga niste porabili, lahko razdelite na delovne alikvote in ponovno zamrznete (največ dvakrat) 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 osebje, usposobljeno za postopke, ki vključujejo indicirano uporabo, za katero je pripomoček zasnovan.

CHANG Medium MF vsebuje FBS in z njim je treba ravnati ob upoštevanju univerzalnih laboratorijskih previdnostnih ukrepov. Medij vsebuje antibiotik (gentamicinijev sulfat) za zmanjšanje tveganja bakterijske kontaminacije, vendar je treba pri razporejanju medijev vedno uporabljati aseptične tehnike. Ne uporabljajte nobenega medija, ki ni rdeče barve.

FUJIFILM

IrvineScientific