

CHANG Medium BMC Bone Marrow Culture Medium

Catalog No. 91004













100mL, 500mL

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

REFERENCES

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

Glossary of Symbols*

	Catalog Number
	Lot Number
	Sterilized using aseptic processing techniques (filtration)
	Expiration: Year - Month - Day
	Caution, consult accompanying documents
	Consult instructions for use
	Storage Temperature below -10°C
	Do not resterilize
	Do not use if package is damaged
	Manufacturer
	CE Mark
	Emergo Europe - Prinsessegracht 20 2514 AP The Hague The Netherlands

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

ENGLISH

INDICATION FOR USE

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

DEVICE DESCRIPTION

CHANG Medium BMC is a ready-to-use medium consisting of RPMI Medium 1640, with FBS, HEPES buffer, L-glutamine, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium and Gentamicin Sulfate. CHANG Medium BMC has been optimized to support efficient cell attachment and growth of bone marrow cells for cytogenetic analysis. No addition of any components prior to culturing bone marrow is required.

COMPONENTS

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

MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

QUALITY ASSURANCE

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

PREPARATION FOR USE

CHANG Medium BMC should be thawed overnight in the refrigerator (2-8°C) then gently mixed to assure homogeneity. Aseptically dispense 10 mL of medium into sterile culture flasks and equilibrate to 37°C for immediate use for bone marrow cultures.

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

DIRECTIONS FOR USE

Sample Preparation:

Use 0.5 to 1.0 mL of sodium heparinized bone marrow aspirate. Lithium heparin, EDTA, or citrate anticoagulants are unsuitable for cytogenetic studies.

- If more than 5 mL of bone marrow aspirate is received, the sample may be hemodilute. Spin the specimen down to isolate the bone marrow fraction.

- If the specimen arrives in transport medium, spin the sample down and remove the transport medium (supernatant). Inoculate using the remaining aspirate fraction.

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.

Bone Marrow Culture:

Label all culture vessels with patient name, specimen number, and culture type. For each specimen prepare a flask containing:

1. 10.0 mL CHANG Medium BMC.
2. Equilibrate flask to 37°C before inoculation of specimen.
3. Inoculate 0.5 mL (500 µL) of specimen, or the appropriate amount depending upon the white blood cell (WBC) count, into each flask containing 10.0 mL pre-equilibrated CHANG Medium BMC. Add less specimen if WBC is high (> 30,000) or more specimen if WBC is low (< 5,000).
4. Incubate flask at 37°C for 1-2 days.

Harvesting the Cultures:

1. Remove cultures from incubator and gently swirl to resuspend cells.
2. Transfer the contents of the flask to a 15 mL centrifuge tube.
3. Add 100 µL of stock Colcemid (10 µg/mL) to each tube.
4. Cap tubes and mix by inverting.
5. Incubate tubes at 37°C for 20 minutes.
6. After incubation, centrifuge tubes for 8 minutes at 1200 rpm (300 x g).
7. Carefully aspirate supernatant from each tube.
8. Resuspend the cell pellet by gently mixing, or flicking the bottom of the tube with forefinger.
9. VERY SLOWLY add 10 mL of hypotonic solution (0.075 M Potassium Chloride) to each tube while vortexing (on the lowest setting).
10. Let tubes stand at room temperature for 20 minutes (hypotonic treatment).
11. Centrifuge tubes for 8 minutes at 1200 rpm (300 x g).
12. Aspirate supernatant leaving about 1.0 mL of hypotonic solution above cell pellet.
NOTE: 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.
13. Resuspend cell pellet as described in step 8.
14. VERY SLOWLY add 10 mL of 3:1 Methanol:Acetic acid fixative to each tube while vortexing (on the lowest setting).
15. Let tubes stand at room temperature for 20 minutes (first fix).
16. Repeat steps 11 - 13.
17. Add 5 mL of fixative as in step 14.
18. Let tubes stand at room temperature for 10 minutes (second fix).
19. Repeat steps 16-18 (third fix).
20. At this point, fixed cell pellets can be used immediately for slide preparation according to the laboratory's standard protocol or stored in the refrigerator (2-8°C) for future use.

STORAGE AND STABILITY

CHANG Medium BMC should be stored frozen below -10°C until ready to use. CHANG Medium BMC is stable until the expiration date shown on the bottle label when stored frozen. After thawing, any unused product can be dispensed into working aliquots and refrozen for later use, or tightly capped and stored at 2°C to 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 BMC contains FBS and GCT conditioned medium and should be handled with universal laboratory precautions. The medium contains an antibiotic (gentamicin) to reduce the potential for bacterial contamination, but aseptic techniques should always be used when dispensing the medium. Do not use any medium that is not red in color.

INDIKATIONEN

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

PRODUKTBESCHREIBUNG

Das CHANG Medium BMC ist ein gebrauchsfertiges Medium, bestehend aus RPMI Medium 1640 mit FBS, HEPES-Puffer, L-Glutamin, konditioniertem Riesenzelltumormedium (GCT) und Gentamicinsulfat. Das CHANG Medium BMC ist für eine effiziente Zellanhaftung und Wachstum von Knochenmarkzellen für die zytogenetische Analyse optimiert. Für die Kultivierung des Knochenmarks ist keine vorherige Zugabe zusätzlicher Stoffe erforderlich.

INHALTSSTOFFE

<u>Aminosäure</u>	<u>Proteine</u>	<u>Vitamine und</u>
Arginin	<u>Hormone und</u>	<u>Spurenelemente</u>
Asparagin	<u>Wachstumsfaktoren</u>	Folsäure
Asparaginsäure	Fetales	Nikotinamid
Cystin	Kälberserum (FBS)	Riboflavin
Glutamin		Thiamin
Glutaminsäure	<u>pH-Indikator</u>	Pantothensäure
Glycin	Phenolrot	Cobalamin
Histidin		Pyridoxin
Hydroxyprolin	<u>Salze und Ionen</u>	Aminobenzoesäure
Isoleucin	Natriumchlorid	
Leucin	Cholinchlorid	<u>Anderer</u>
Lysin	Kaliumchlorid	Riesenzelltumorkonditioniertes
Methionin	Magnesiumsulfat	Medium (GCT-CM)
Phenylalanin	Natriumphosphat	Glutathion
Prolin	Calciumnitrat	Biotin
Serin		
Threonin	<u>Puffer</u>	
Tryptophan	Natriumbicarbonat	<u>Energiesubstrate</u>
Tyrosin	HEPES	Glukose
Valin		Inositol
	<u>Antibiotikum</u>	
	Gentamicinsulfat	

Wasser
Wasser für
Injektionszwecke
(WFI)

ERFORDERLICHE MATERIALIEN UND HILFSSTOFFE (NICHT IM LIEFERUMFANG)

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

QUALITÄTSSICHERUNG

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

VORBEREITUNG

Das CHANG Medium BMC sollte über Nacht im Kühlschrank (2–8 °C) aufgetaut und für eine optimale Homogenität anschließend vorsichtig gemischt werden. 10 ml Medium in sterile Kulturflaschen pipettieren und zur sofortigen Verwendung für Knochenmarkkulturen auf 37 °C erwärmen.

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

GEBRAUCHSANWEISUNG

Probenvorbereitung:

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

- Wurden mehr als 5 ml Knochenmarkspirat erhalten, ist die Probe möglicherweise hämodiluiert. Die Probe herunterzentrifugieren, um die Knochenmarkfraktion zu isolieren.
- Wenn die Probe in einem Transportmedium geliefert wurde, die Probe herunterzentrifugieren und das Transportmedium (Überstand) entfernen. Mit der restlichen Aspiratfraktion beimpfen.

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

Knochenmarkkultur:

Alle Kulturgefäße mit Patientennamen, Probennummer und Kulturtyp beschriften. Für jede Probe eine Flasche mit Folgendem vorbereiten:

1. 10,0 ml CHANG Medium BMC.
2. Die Flasche vor der Beimpfung auf 37 °C äquilibrieren.
3. 0,5 ml (500 µl) Probe oder eine der Leukozytenzahl (LEU) entsprechenden Menge in jede der voräquilibrierten Flaschen mit den 10,0 ml CHANG Medium BMC impfen. Bei hohem Leukozytengehalt (> 30.000) weniger Probe bzw. bei geringem Leukozytengehalt (< 5.000) mehr Probe hinzugeben.
4. Die Flaschen 1–2 Tage bei 37 °C inkubieren.

Kulturgewinnung:

1. Die Kulturflaschen aus dem Inkubator nehmen und leicht schwenken, um die Zellen zu resuspendieren.
2. Den Inhalt aus der Flasche in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen übertragen.
3. In jedes Röhrchen 100 µl Colcemid (10 µg/ml) geben.
4. Die Röhrchen verschließen und durch Überkopfdrehen mischen.
5. Die Röhrchen 20 Minuten bei 37 °C inkubieren.
6. Die Röhrchen im Anschluss an die Inkubation 8 Minuten bei 1.200 U/min (300 x g) zentrifugieren.
7. Überstand von jedem Röhrchen vorsichtig absaugen.
8. Das Zellpellet durch vorsichtiges Mischen oder Anschneiden des Röhrchenbodens mit dem Zeigefinger resuspendieren.
9. GANZ LANGSAM 10 ml hypotone Lösung (0,075 M Kaliumchlorid) in jedes Röhrchen geben, während der Vortexmischer (auf niedrigster Stufe) läuft.
10. Die Röhrchen 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen (hypotone Behandlung).
11. Die Röhrchen 8 Minuten bei 1.200 U/min (300 x g) zentrifugieren.
12. So viel Überstand absaugen, dass etwa 1,0 ml hypotone Lösung über dem Zellpellet verbleiben.
HINWEIS: Beim Absaugen nach dem Zentrifugieren auf Fasermaterial vom Zellpellet achten, das eventuell in den Überstand hineinragen könnte. Die letzten ml Überstand sollten ggf. von Hand mit einer Pasteurpipette entfernt werden (ohne Vakuumaspiration), um zu verhindern, dass das ganze Zellpellet in den Abfallbehälter eingesaugt wird.
13. Das Zellpellet wie in Schritt 8 beschrieben resuspendieren.
14. GANZ LANGSAM 10 ml Fixiermittel Methanol: Essigsäure im Verhältnis 3:1 in jedes Röhrchen geben, während der Vortex-Mischer (auf niedrigster Stufe) läuft.
15. Die Röhrchen 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen (erste Fixierung).

16. Schritte 11–13 wiederholen.

17. 5 ml Fixiermittel gemäß Schritt 14 hinzugeben.

18. Die Röhrchen 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen (zweite Fixierung).

19. Schritte 16–18 (dritte Fixierung) wiederholen.

20. 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) aufbewahrt werden.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Das CHANG Medium BMC sollte bis zur Verwendung unter -10 °C tiefgekühlt gelagert werden. Bei Tiefkühlung ist das CHANG Medium BMC bis zu dem auf dem Flaschenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Nach dem Auftauen kann jedes unbenutzte Produkt in Arbeitsquote abgefüllt und zur späteren Verwendung wieder eingefroren oder fest verschlossen und bei 2 °C bis 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 BMC enthält FBS- und GCT-konditioniertes Medium und muss unter Einhaltung der in Laboren universell geltenden Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden. Das Medium enthält ein Antibiotikum (Gentamicin), um das Risiko einer bakteriellen Kontamination zu verringern. Bei der Abgabe des Mediums sollten jedoch immer aseptische Techniken angewendet werden. Keine Medien verwenden, die nicht rot sind.

INDICAZIONI PER L'USO

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

DESCRIZIONE DEL DISPOSITIVO

CHANG Medium BMC è un terreno pronto all'uso composto da terreno RPMI 1640 con l'aggiunta di siero bovino fetale, tampone HEPEs, L-glutammina, terreno condizionato da tumore a cellule giganti (GCT) e gentamicina solfato. CHANG Medium BMC è stato ottimizzato per favorire un'efficace adesione cellulare e la crescita di cellule di midollo osseo per l'analisi citogenica. Non è necessario aggiungere alcun altro componente prima di avviare la coltura delle cellule di midollo osseo.

COMPONENTI

<u>Aminoacidi</u>	<u>Proteine, ormoni e fattori di crescita</u>	<u>Vitamine ed elementi in tracce</u>
Arginina	Siero bovino fetale	Acido folico
Asparagina		Nicotinamide
Acido aspartico		Riboflavina
Cistina	<u>Indicatore di pH</u>	Tiamina
Glutammina	Rosso fenolo	Acido pantotenico
Acido glutammico		Cobalamina
Glicina	<u>Sali e ioni</u>	Piridossina
Istidina	Cloruro di sodio	Acido amminobenzoico
Idrossiprolina	Cloruro di colina	
Isoleucina	Cloruro di potassio	<u>Altro</u>
Leucina	Solfato di magnesio	Terreno condizionato da tumore a cellule giganti (GCT-CM)
Lisina	Fosfato di sodio	Glutazione
Metionina	Nitrato di calcio	Biotina
Fenilalanina		
Prolina	<u>Tamponi</u>	
Serina	Bicarbonato di sodio	
Treonina	HEPEs	
Triptofano		
Tirosina		
Valina	<u>Antibiotico</u>	<u>Substrati energetici</u>
	Gentamicina solfato	Glucosio
		Inositolio

Acqua

Qualità WFI (acqua per iniezioni)

MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI MA NON FORNITI

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

GARANZIA DI QUALITÀ

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

PREPARAZIONE PER L'USO

Scongela CHANG Medium BMC per una notte in frigorifero (2-8 °C) quindi miscelare delicatamente per rendere omogeneo. Dispensare in condizioni di sterilità 10 ml di terreno in fiasche per coltura sterili e portare a 37 °C per l'uso immediato per colture di midollo osseo.

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

ISTRUZIONI PER L'USO

Preparazione del campione:

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

- Qualora si riceva più di 5 ml di aspirato midollare, il campione può essere emodiluito. Centrifugare il campione per isolare la frazione di midollo osseo.
- Se il campione arriva in un terreno di trasporto, centrifugarlo per farlo depositare e rimuovere il terreno di trasporto (surnatante). Inoculare utilizzando la parte rimanente di aspirato.

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.

Coltura di midollo osseo

Etichettare tutti i contenitori culturali con il nome del paziente, il numero del campione e il tipo di coltura. Per ogni campione preparare una fiasca contenente:

1. 10,0 ml di CHANG Medium BMC.
2. Portare la fiasca a 37 °C prima di inoculare il campione.
3. Inoculare 0,5 ml (500 µl) di campione, oppure la quantità appropriata in funzione della conta leucocitaria, in ogni fiasca contenente 10,0 ml di CHANG Medium BMC preriscaldato. Aggiungere una quantità inferiore di campione se la conta leucocitaria è alta (> 30.000), o maggiore se la conta è bassa (< 5000).
4. Incubare la fiasca a 37 °C per 1-2 giorni.

Raccolta delle colture

1. Rimuovere le colture dall'incubatore e agitare delicatamente per risospendere le cellule.
2. Trasferire il contenuto della fiasca in una provetta per centrifuga da 15 ml.
3. Aggiungere 100 µl di Colcemid soluzione stock (10 µg/ml) a ogni provetta.
4. Chiudere le provette e miscelare capovolgendo.
5. Incubare le provette a 37 °C per 20 minuti.
6. Dopo l'incubazione, centrifugare per 8 minuti a 1200 giri/min (300 x g).
7. Aspirare con attenzione il surnatante da ogni provetta.
8. Risospendere il pellet cellulare agitando delicatamente o picchiando il fondo della provetta con l'indice.
9. Aggiungere MOLTO LENTAMENTE 10 ml di soluzione ipotonica (cloruro di potassio 0,075 M) a ogni provetta mentre questa è inserita nel miscelatore Vortex alla velocità minima.
10. Lasciare le provette a temperatura ambiente per 20 minuti (trattamento ipotonico).
11. Centrifugare per 8 minuti a 1200 giri/min (300 x g).
12. Aspirare il surnatante lasciando circa 1,0 ml di soluzione ipotonica sopra il pellet cellulare. NOTA: fare attenzione 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.
13. Risospendere il pellet come descritto al punto 8.
14. Aggiungere MOLTO LENTAMENTE 10 ml di fissativo (metanolo:acido acetico 3:1) a ogni provetta mentre questa è inserita nel miscelatore Vortex alla velocità minima.
15. Lasciare le provette a temperatura ambiente per 20 minuti (primo fissaggio).
16. Ripetere i punti da 11 a 13.
17. Aggiungere 5 ml di fissativo come descritto al punto 14.

18. Lasciare le provette a temperatura ambiente per 10 minuti (secondo fissaggio).

19. Ripetere i punti da 16 a 18 (terzo fissaggio).

20. A questo punto, i pellet cellulari fissati possono essere usati immediatamente per preparare il vetrino secondo il protocollo standard del laboratorio oppure conservati in frigorifero a 2-8 °C per l'uso successivo.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

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

PRECAUZIONI E AVVERTENZE

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

CHANG Medium BMC contiene terreno condizionato per GCT e siero bovino fetale e deve essere maneggiato secondo le normali precauzioni di laboratorio. Il terreno contiene un antibiotico (gentamicina) 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.

FRANÇAIS

INDICATION D'UTILISATION

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

DESCRIPTION DU DISPOSITIF

CHANG Medium BMC est un milieu prêt à l'emploi composé de RPMI Medium 1640, contenant du SVF, un tampon d'HEPES, de la glutamine L, un milieu conditionné de tumeur à cellules géantes (TCG) et du sulfate de gentamicine. CHANG Medium BMC a été optimisé pour favoriser la fixation cellulaire et la croissance des cellules de moelle osseuse efficaces lors de l'analyse cytogénétique. La culture de la moelle osseuse ne nécessite l'ajout d'aucun composant.

COMPOSANTS

Acides aminés	Indicateur de pH	Vitamines et oligo-éléments
Arginine	Rouge de phénol	Acide folique
Asparagine		Nicotinamide
Acide aspartique	<u>Sels et ions</u>	Riboflavine
Cystine	Chlorure de sodium	Thiamine
Glutamine	Chlorure de choline	Acide pantothénique
Acide glutamique	Chlorure de potassium	Cobalamine
Glycine	Chlorure de magnésium	Pyridoxine
Histidine	Phosphate de sodium	Acide aminobenzoïque
Hydroxyproline	Phosphate de calcium	<u>Autre</u>
Isoleucine	Nitrate de calcium	Milieu conditionné de tumeur à cellules géantes (TCG)
Leucine		Glutathione
Lysine	<u>Tampons</u>	Biotine
Méthionine	Bicarbonate de sodium	<u>Substrats énergétiques</u>
Phénylalanine	HEPES	Glucose
Proline		Inositol
Sérine	<u>Antibiotique</u>	
Thréonine	Sulfate de gentamicine	
Tryptophane		
Tyrosine		
Valine		

Eau

Qualité WF1

Protéines, hormones et facteurs de croissance

Sérum de veau foetal (SVF)

MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT

NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

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

ASSURANCE QUALITÉ

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

PRÉPARATION

CHANG Medium BMC doit être décongelé la veille dans le réfrigérateur (entre 2 et 8 °C), puis mélangé 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 dans des cultures de moelle osseuse.

Remarque : des cristaux de carbonate de calcium se forment en général dans CHANG Medium BMC. Rien n'indique que la présence de ces cristaux ne compromette les performances du produit.

MODE D'EMPLOI

Préparation des échantillons :

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

- Si plus de 5 ml d'aspirat de moelle osseuse est prélevé, l'échantillon peut être hémodilué. Isoler la fraction de moelle osseuse de l'échantillon par centrifugation.
- Si l'échantillon est livré dans un milieu de transport, isoler le surnageant par centrifugation puis le prélever. Inoculer à l'aide de la fraction résiduelle de l'aspirat.

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.

Culture de moelle osseuse :

Identifier tous les flacons de culture avec le nom du patient, le numéro de l'échantillon et le type de culture. Pour chaque échantillon, préparer un flacon contenant :

1. 10,0 ml de CHANG Medium BMC.
2. Équilibrer le flacon à 37 °C avant l'inoculation de l'échantillon.
3. Inoculer 0,5 ml (500 µl) d'échantillon, ou la quantité appropriée suivant la numération leucocytaire, dans chaque flacon contenant 10,0 ml de CHANG Medium BMC pré-équilibré. Ajouter moins d'échantillons si la numération leucocytaire est élevée (> 30 000) ou plus si elle est faible (< 5 000).
4. Incuber le flacon à 37 °C pendant un jour ou deux.

Collecte des cultures :

1. Sortir les cultures de l'étuve et les agiter légèrement pour remettre les cellules en suspension.
2. Transférer le contenu du flacon dans un tube pour centrifugeuse de 15 ml.
3. Ajouter 100 µl de solution mère de Colcemid (10 µg/ml) dans chaque tube.
4. Boucher les tubes et les retourner pour mélanger le contenu.
5. Incuber les tubes à 37 °C pendant 20 minutes.
6. Après l'incubation, centrifuger les tubes pendant 8 minutes à 1 200 tr/min (300 x g).
7. Aspirer délicatement le surnageant de chaque tube.
8. Remettre le culot en suspension en le mélangeant doucement, ou en tapant le fond du tube avec l'index.
9. Ajouter TRÈS LENTEMENT 10 ml de solution hypotonique (0,075 M de chlorure de potassium) à chaque tube tout en le mélangeant au vortex (réglage le plus faible).
10. Laisser les tubes à température ambiante pendant 20 minutes (traitement hypotonique).
11. Centrifuger les tubes pendant 8 minutes à 1 200 tr/min (300 x g).
12. Aspirer le surnageant en laissant environ 1,0 ml de solution hypotonique sur le culot de cellules. REMARQUE : prendre garde au matériau fibreux qui pourrait s'étendre du culot de cellules dans le surnageant après la centrifugation. Il pourra être nécessaire de prélever les quelques derniers millilitres de surnageant manuellement et à l'aide d'une pipette Pasteur (sans aspiration à vide) pour éviter d'aspirer l'ensemble du culot dans le récipient à déchets.
13. Remettre le culot de cellules en suspension, comme décrit à l'étape 8.

14. Ajouter TRÈS LENTEMENT 10 ml de solution de fixation (méthanol/acide acétique dans une proportion de 3:1) à chaque tube tout en le mélangeant au vortex (réglage le plus faible).
15. Laisser les tubes à température ambiante pendant 20 minutes (première fixation).
16. Répéter les étapes 11 à 13.
17. Ajouter 5 ml de solution de fixation, conformément à l'étape 14.
18. Laisser les tubes à température ambiante pendant 10 minutes (deuxième fixation).
19. Répéter les étapes 16 à 18 (troisième fixation).
20. 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) pour utilisation ultérieure.

CONSERVATION ET STABILITÉ

CHANG Medium BMC doit être conservé congelé à moins de -10 °C jusqu'à ce qu'il soit prêt à être utilisé. CHANG Medium BMC est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon lorsqu'il est conservé congelé. Après la décongélation, tout produit non entamé peut être réparti dans des aliquotes de travail et recongelé 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 BMC contient du SVF et un milieu conditionné de TCG et doit être manipulé en utilisant les précautions d'usage universelles. Le milieu contient un antibiotique (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.

INDICACIÓN DE USO

El CHANG Medium BMC está diseñado para ser utilizado en cultivos clínicos de médula ósea humana para cariotipado y otras pruebas genéticas de diversos trastornos hematológicos.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El CHANG Medium BMC es un medio listo para usar que se compone del RPMI Medium 1640, con FBS, tampón HEPES, L-glutamina, medio acondicionado con tumor de células gigantes (GCT) y sulfato de gentamicina. El CHANG Medium BMC se ha optimizado para fomentar una adhesión celular eficiente y el crecimiento de las células de la médula ósea sometidas a análisis citogenético. No es necesario añadir ningún componente antes de cultivar la médula ósea.

COMPONENTES

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

MATERIAL Y EQUIPO NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

GARANTÍA DE CALIDAD

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

PREPARACIÓN PARA EL USO

El CHANG Medium BMC se descongelará durante la noche en el frigorífico (2-8 °C) y luego se mezclará 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 en los cultivos de médula ósea.

Nota: En el CHANG Medium BMC 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

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

- Si se reciben más de 5 ml de aspirado de médula ósea, la muestra podría estar hemodiluida. Centrifugar la muestra para aislar la fracción de médula ósea.
- Si la muestra llega en un medio de transporte, centrifugarla y eliminar el medio de transporte (sobrenadante). Inocular utilizando la fracción remanente del aspirado.

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.

Cultivo de médula ósea:

Etiquetar todos los recipientes de cultivo con el nombre del paciente, el número de la muestra y el tipo de cultivo. Para cada muestra, preparar un frasco que contenga:

1. 10,0 ml del CHANG Medium BMC.
2. Equilibrar el frasco a 37 °C antes de inocular la muestra.
3. Inocular 0,5 ml (500 µl) de muestra, o la cantidad adecuada en función del recuento leucocitario (RL), en cada frasco que contenga 10,0 ml del CHANG Medium BMC preequilibrado. Añadir menos cantidad de muestra si el RL es alto (>30.000) o más si es bajo (<5.000).
4. Incubar el frasco a 37 °C durante 1-2 días.

Cosecha de los cultivos:

1. Sacar los cultivos de la incubadora y balancearlos con suavidad para resuspender las células.
2. Transferir el contenido del frasco a un tubo de centrifuga de 15 ml.
3. Añadir 100 µl de la solución madre Colcemid (10 µg/ml) a cada tubo.
4. Tapar los tubos y mezclar mediante inversión.
5. Incubar el frasco a 37 °C durante 20 minutos.
6. Después de la incubación, colocar los tubos de centrifuga durante 8 minutos a 1200 rpm (300 g).
7. Aspirar con cuidado el sobrenadante de cada tubo.
8. Resuspender el sedimento celular mezclando o golpeando con suavidad el fondo del tubo con el dedo índice.
9. Añadir MUY LENTAMENTE 10 ml de solución hipotónica (cloruro potásico 0,075 M) a cada tubo mientras se agita en el vórtex (con el ajuste más bajo).
10. Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente durante 20 minutos (tratamiento hipotónico).
11. Centrifugar los tubos durante 8 minutos a 1200 rpm (300 g).
12. Aspirar el sobrenadante dejando aproximadamente 1,0 ml de solución hipotónica por encima del sedimento celular.
NOTA: 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.
13. Resuspender el sedimento celular como se describe en el paso 8.
14. Añadir MUY LENTAMENTE 10 ml de la solución fijadora de metanol y ácido acético (3:1) a cada tubo mientras se agita en el vórtex (con el ajuste más bajo).
15. Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente durante 20 minutos (primera fijación).
16. Repetir los pasos 11-13.
17. Añadir 5 ml de fijador como en el paso 14.

18. Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos (segunda fijación).
19. Repetir los pasos 16-18 (tercera fijación).
20. En este momento, las esferas celulares fijadas se pueden utilizar de inmediato para preparar los portaobjetos según el protocolo estándar del laboratorio o conservar en el frigorífico (2-8 °C) para su uso futuro.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

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

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

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

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

PORTUGUÊS

INDICAÇÃO DE UTILIZAÇÃO

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

DESCRIÇÃO DO DISPOSITIVO

O CHANG Medium BMC é um meio pronto a utilizar constituído por RPMI Medium 1640 com FBS, tampão HEPES, L-glutamina, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium e sulfato de gentamicina. O CHANG Medium BMC foi otimizado de modo a suportar a ligação e o crescimento eficientes de células da medula óssea para análise citogenética. Sem adição de quaisquer componentes antes de a cultura de medula óssea ser necessária.

COMPONENTES

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

MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

1. Tubos de centrifugadora estéreis de plástico e frascos de cultura
2. Incubadora de CO₂ a 37 °C
3. Centrifugadora de bancada
4. Misturador de vórtice
5. Colcemid Stock Solution, 10 µg/ml
6. Solução de cloreto de potássio, 0,075 M
7. Solução de fixação, metanol:ácido acético (3:1)

GARANTIA DE QUALIDADE

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

PREPARAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO

O CHANG Medium BMC deve ser descongelado de um dia para o outro no frigorífico (2 °C–8 °C) e depois misturado suavemente para assegurar a homogeneidade. Dispense assepticamente 10 ml de meio para frascos de cultura estéreis e deixe atingir os 37 °C para utilização imediata em culturas de medula óssea.

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

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Preparação da amostra:

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

- Caso se receba mais de 5 ml de aspirado de medula óssea, a amostra pode ficar hemodiluída. Centrifugue o espécime, para isolar a fração da medula óssea.
- Se o espécime chegar em meio de transporte, centrifugue a amostra e retire o meio de transporte (sobrenadante). Inocule utilizando a restante fração do aspirado.

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.

Cultura de medula óssea:

Identifique todos os recipientes de cultura com o nome do doente, o número de amostra e o tipo de cultura. Prepare um frasco de cultura para cada espécime, contendo:

1. 10,0 ml de CHANG Medium BMC.
2. Antes da inoculação do espécime, deixe o frasco de cultura atingir os 37 °C.
3. Inocule 0,5 ml (500 µl) de espécime, ou a quantidade adequada dependendo da contagem de glóbulos brancos, para cada frasco de cultura contendo 10,0 ml de CHANG Medium BMC pré-equilibrado. Adicione uma maior quantidade de espécime se a contagem de glóbulos brancos for alta (> 30 000) ou uma menor quantidade se a contagem de glóbulos brancos for baixa (< 5000).
4. Incube o frasco de cultura a 37 °C durante 1–2 dias.

Colheita de culturas:

1. Retire as culturas da incubadora e gire-as suavemente para ressuspender as células.
2. Transfira o conteúdo do frasco de cultura para um tubo de centrifugadora de 15 ml.
3. Adicione 100 µl de solução de stock Colcemid (10 µg/ml) a cada tubo.
4. Tape os tubos e misture, invertendo-os.
5. Incube os tubos a 37 °C durante 20 minutos.
6. Após a incubação, centrifugue os tubos durante 8 minutos a 1200 rpm (300 x g).
7. Aspire o sobrenadante de cada tubo com cuidado.
8. Ressuspenda o *pellet* de células, misturando suavemente ou batendo no fundo do tubo com o dedo indicador.
9. Adicione MUITO LENTAMENTE 10 ml de solução hipotónica (cloreto de potássio 0,075 M) a cada tubo durante a mistura no misturador de vórtice (na definição mais baixa).
10. Deixe os tubos repousarem à temperatura ambiente durante 20 minutos (tratamento hipotónico).
11. Centrifugue os tubos durante 8 minutos a 1200 rpm (300 x g).
12. Aspire o sobrenadante, deixando cerca de 1,0 ml de solução hipotónica acima do *pellet* de células.
NOTA: 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.
13. Ressuspenda o *pellet* de células tal como descrito no passo 8.
14. Adicione MUITO LENTAMENTE 10 ml de fixador de 3:1 de metanol:ácido acético a cada tubo durante a mistura no misturador de vórtice (na definição mais baixa).

15. Deixe os tubos repousarem à temperatura ambiente durante 20 minutos (primeira fixação).
16. Repita os passos 11 a 13.
17. Adicione 5 ml de fixador, tal como no passo 14.
18. Deixe os tubos repousarem à temperatura ambiente durante 10 minutos (segunda fixação).
19. Repita os passos 16 a 18 (terceira fixação).
20. 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) para utilização futura.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

O CHANG Medium BMC deve ser conservado congelado a uma temperatura inferior a -10 °C até estar pronto para utilizar. O CHANG Medium BMC 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 aliquotas de trabalho e recongelado para utilização posterior ou bem tapado e conservado entre 2 °C e 8 °C durante um período de até 30 dias. Proteger da luz fluorescente.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

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

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

ΕΝΔΕΙΞΗ ΧΡΗΣΗΣ

Το CHANG Medium BMC προορίζεται για χρήση στην πρωτογενή καλλιέργεια κλινικών καλλιεργιών ανθρώπινου μυελού των οστών για καρυστοποίηση και άλλες γενετικές εξετάσεις για διάφορες αιματολογικές διαταραχές.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ

Το CHANG Medium BMC είναι ένα έτοιμο για χρήση μέσο που αποτελείται από RPMI Medium 1640, με FBS, ρυθμιστικό διάλυμα HEPES, L-γλουταμίνη, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium και θειική γενταμικίνη. Το CHANG Medium BMC έχει βελτιστοποιηθεί για την υποστήριξη της αποτελεσματικής κυτταρικής προσκόλλησης και ανάπτυξης κυτάρων μυελού των οστών για κυτταρογενετική ανάλυση. Δεν απαιτείται προσθήκη οποιουδήποτε συστατικού πριν από την καλλιέργεια του μυελού των οστών.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Αμινοξύ	Πρωτεΐνες, ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες	Αντιβιοτικό
Αργινίνη	Ορός από έμβρυο βοοειδών (FBS)	Θειική γενταμικίνη
Ασπαράγινη	Βιταμίνες και ιχνοστοιχεία	
Ασπαρτικό οξύ	Φυλλικό οξύ	
Κυστίνη	Νικοτινική	
Γλουταμίνη	Ριβοφλαβίνη	
Γλουταμικό οξύ	Θειαμίνη	
Γλυκίνη	Παντοθενικό οξύ	
Ιστιδίνη	Κοβαλαμίνη	
Υδροξυπρολίνη	Πυριδοξίνη	
Ισολευκίνη	Αμινοβενζοϊκό οξύ	
Λευκίνη	Άλλα	
Λυσίνη	Giant cell tumor conditioned medium (GCT-CM)	
Μεθειονίνη	Γλουταθειονίνη	
Φαινυλαλανίνη	Βιοτίνη	
Προλίνη	Ενεργειακά υποστρώματα	
Σερίνη	Γλυκόζη	
Θρεονίνη	Ινοσιτόλη	
Τρυπτοφάνη		
Τυροσίνη		
Βαλίνη		
Νερό		
Ποιότητα ενέσιμου ύδατος (WFI)		

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

1. Πλαστικά, αποστειρωμένα σωληνάρια φυγόκεντρου και μπουκαλάκια καλλιέργειας
2. Επωαστήρας CO₂ στους 37 °C
3. Επιτραπέζια φυγόκεντρος
4. Αναμίκτης στροβιλισμού
5. Αποθεματικό διάλυμα κολοσεμίδης, 10 µg/mL
6. Διάλυμα χλωριούχου καλίου, 0,075 M
7. Διάλυμα μονιμοποίησης, μεθανόλη:οξικό οξύ (3:1)

ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

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

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ

Το CHANG Medium BMC θα πρέπει να αποψύχεται κατά τη διάρκεια της νύχτας στο ψυγείο (2-8 °C) και στη συνέχεια να αναμιγνύεται 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 σε καλλιέργειες μυελού των οστών.

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

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

Προετοιμασία δειγμάτων:

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

- Εάν ληφθούν περισσότερα από 5 mL του υλικού αναρρόφησης του μυελού των οστών, το δείγμα μπορεί να είναι αραιωμένο με αίμα. Φυγοκεντρίστε το δείγμα για να απομονώσετε το κλάσμα του μυελού των οστών.
- Εάν το δείγμα παραληφθεί σε μέσο μεταφοράς, φυγοκεντρίστε το δείγμα και αφαιρέστε το μέσο μεταφοράς (υπερκείμενο). Ενοφθαλμίστε χρησιμοποιώντας το υπόλοιπο κλάσμα του υλικού αναρρόφησης.

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

Καλλιέργεια μυελού των οστών:

Επισημάνετε όλα τα δοχεία καλλιέργειας με το όνομα του ασθενούς, τον αριθμό δείγματος και τον τύπο της καλλιέργειας. Για κάθε δείγμα προετοιμάστε ένα μπουκαλάκι που περιέχει τα εξής:

1. 10,0 mL CHANG Medium BMC.
2. Εξισορροπήστε το μπουκαλάκι στους 37 °C πριν από τον ενοφθαλμισμό του δείγματος.
3. Ενοφθαλμίστε 0,5 mL (500 µL) δείγματος, ή την κατάλληλη ποσότητα ανάλογα με τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (white blood cell, WBC), σε κάθε μπουκαλάκι που περιέχει 10,0 mL ήδη εξισορροπημένο CHANG Medium BMC. Προσθέστε μικρότερη ποσότητα δείγματος εάν ο αριθμός των WBC είναι υψηλός (> 30.000) ή μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος εάν ο αριθμός των WBC είναι χαμηλός (< 5.000).
4. Επωάστε το μπουκαλάκι στους 37 °C για 1-2 ημέρες.

Συλλογή καλλιεργιών:

1. Αφαιρέστε τις καλλιέργειες από τον επωαστήρα και περιδινίστε με ήπιες κινήσεις για την επανεναιώρηση των κυτάρων.
2. Μεταφέρετε το περιεχόμενο που έχει το μπουκαλάκι σε σωληνάριο φυγόκεντρου των 15 mL.
3. Προσθέστε 100 µL αποθεματικού διαλύματος κολοσεμίδης (10 µg/mL) σε κάθε σωληνάριο.
4. Πωματίστε τα σωληνάρια και αναμείξτε με αναστροφή.
5. Επωάστε τα σωληνάρια στους 37 °C για 20 λεπτά.
6. Μετά την επώαση, φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια για 8 λεπτά στις 1.200 σ.α.λ. (300 x g).
7. Αναρροφήστε προσεκτικά το υπερκείμενο από κάθε σωληνάριο.
8. Επαναλάβετε την εναιώρηση του κυτταρικού συσσωμάτωματος αναμειγνύοντας με ήπιες κινήσεις ή τινάζοντας το κάτω μέρος του σωληναρίου με τον δείκτη του χεριού.
9. Προσθέστε POLY ΑΡΓΑ 10 mL υποτονικού διαλύματος (0,075 M χλωριούχου καλίου) σε κάθε σωληνάριο ενόσω αναδεύετε με αναμίκτη στροβιλισμού (στη χαμηλότερη ρύθμιση).
10. Αφήστε τα σωληνάρια να παραμείνουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά (επεξεργασία με υποτονικό διάλυμα).
11. Φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια για 8 λεπτά στις 1.200 σ.α.λ. (300 x g).

12. Αναρροφήστε το υπερκείμενο αφήνοντας περίπου 1,0 mL υποτονικού διαλύματος πάνω από το κυτταρικό συσσωμάτωμα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Προσέχετε το ινώδες υλικό που μπορεί να επεκταθεί από το κυτταρικό συσσωμάτωμα προς τα πάνω και μέσα στο υπερκείμενο υγρό μετά τη φυγοκέντρωση. Τα τελευταία λίγα mL του υπερκείμενου υγρού μπορεί να πρέπει να αφαιρεθούν χειρωνακτικά με πιπέτα Παστέρ (χωρίς να χρησιμοποιηθεί αναρρόφηση κενού) για να αποφευχθεί η αναρρόφηση ολόκληρου του κυτταρικού συσσωμάτωματος στον κάδο απορριμμάτων.

13. Επαναλάβετε την εναιώρηση του κυτταρικού συσσωμάτωματος, όπως περιγράφεται στο βήμα 8.
14. Προσθέστε POLY ΑΡΓΑ 10 mL διαλύματος μονιμοποίησης μεθανόλης:οξικό οξύ σε αναλογία 3:1 σε κάθε σωληνάριο, ενόσω αναδεύετε με αναμίκτη στροβιλισμού (στη χαμηλότερη ρύθμιση).
15. Αφήστε τα σωληνάρια να παραμείνουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά (πρώτη μονιμοποίηση).
16. Επαναλάβετε τα βήματα 11-13.
17. Προσθέστε 5 mL διαλύματος μονιμοποίησης, όπως στο βήμα 14.
18. Αφήστε τα σωληνάρια να παραμείνουν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά (δεύτερη μονιμοποίηση).
19. Επαναλάβετε τα βήματα 16-18 (τρίτη μονιμοποίηση).
20. Σε αυτό το σημείο, τα μονιμοποιημένα κυτταρικά συσσωμάτωμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμέσως για την προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλάκων, σύμφωνα με το τυπικό πρωτόκολλο του εργαστηρίου ή να φυλαχθούν στο ψυγείο (2-8 °C) για μελλοντική χρήση.

ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Το CHANG Medium BMC θα πρέπει να φυλάσσεται κατεψυγμένο, κάτω από τους -10 °C, μέχρι να ειστε έτοιμοι να το χρησιμοποιήσετε. Το CHANG Medium BMC 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 για επακόλουθη χρήση ή να πωματιστεί σφικτά και να φυλαχθεί στους 2 °C έως 8 °C, για έως και 30 ημέρες. Προστατέψτε το από φθορίζον φως.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΙΣ

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 BMC περιέχει FBS και GCT conditioned medium και ο χειρισμός του θα πρέπει να γίνεται με τη λήψη των γενικών εργαστηριακών προφυλάξεων. Το μέσο περιέχει ένα αντιβιοτικό (γενταμικίνη) 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.

INDICATIE VOOR GEBRUIK

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

BESCHRIJVING VAN HET HULPMIDDEL

CHANG Medium BMC is een kant-en-klaar medium bestaande uit RPMI Medium 1640 met FBS, HEPES buffer, L-glutamine, Giant Cell Tumor (GCT) geconditioneerd medium en gentamicinesulfaat. CHANG Medium BMC is geoptimaliseerd ter ondersteuning van een efficiënte celhechting en groei van beenmergcellen voor cytogenetische analyse. Toevoeging van componenten is niet vereist voordat het beenmerg op kweek wordt gezet.

COMPONENTEN

<u>Aminozuren</u>	<u>Eiwitten, hormonen en groeifactoren</u>	<u>Vitaminen en spoorelementen</u>
Arginine	Foetaal runderserum (FBS)	Foliumzuur
Asparagine		Nicotinamide
Asparaginezuur		Riboflavine
Cystine		Thiamine
Glutamine	<u>pH-indicator</u>	Pantotheenzuur
Glutaminezuur	Fenolrood	Cobalamine
Glycine		Pyridoxine
Histidine	<u>Zouten en ionen</u>	Aminobenzoëzuur
Hydroxyproline	Natriumchloride	
Isoleucine	Cholinechloride	<u>Overige</u>
Leucine	Kaliumchloride	Giant Cell Tumor geconditioneerd medium (GCT-CM)
Lysine	Magnesiumsulfaat	Glutathion
Methionine	Natriumfosfaat	Biotine
Fenylalanine	Calciumnitraat	
Proline		<u>Energiesubstraten</u>
Serine	<u>Buffers</u>	Glucose
Treonine	Natriumbicarbonaat	Inositol
Tryptofaan	HEPES	
Tyrosine		
Valine	<u>Antibioticum</u>	
	Gentamicinesulfaat	

Water
 Farmaceutisch kwaliteitswater (WFI)

VEREISTE MAAR NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN EN APPARATUUR

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

KWALITEITSBORING

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

VOORBEREIDING OP HET GEBRUIK

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

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

GEBRUIKSAANWIJZING

Monsterpreparatie:
 Gebruik 0,5 tot 1,0 ml met natrium gehepariniseerd beenmergaspiraart. Lithiumheparine, EDTA of citraatanticoagulanten zijn niet geschikt voor cytogenetisch onderzoek.

- Als meer dan 5 ml beenmergaspiraart wordt ontvangen, kan er sprake zijn van hemodilutie van het monster. Centrifugeer het monster om de beenmergfractie te isoleren.
- Als het monster in transportmedium wordt ontvangen, moet u het monster centrifugeren en het transportmedium (supernatant) verwijderen. Inoculeer met behulp van de resterende aspiraattractie.

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.

Beenmergkweek:

Plak op alle kweekflessen een label met daarop de naam van de patiënt, het monsternummer en het kweektype. Prepareer voor elk monster een fles met daarin:

1. 10,0 ml CHANG Medium BMC.
2. Equilibreer de fles tot 37 °C voordat u het monster inoculeert.
3. Inoculeer in elke fles met 10,0 ml gepreëquilibreerd CHANG Medium BMC 0,5 ml (500 µl) van het monster of de juiste hoeveelheid afhankelijk van de telling van het aantal witte bloedcellen (WBC). Voeg minder van het monster toe als de WBC-telling hoog is (> 30.000) of meer van het monster als de WBC-telling laag is (< 5000).
4. Incubeer de fles gedurende 1 à 2 dagen bij 37 °C.

Oogsten van de kweken:

1. Haal de kweken uit de incubator en draai ze voorzichtig rond om de cellen te resuspenden.
2. Breng de inhoud van de fles over naar een centrifugeerbuisje van 15 ml.
3. Voeg aan elk buisje 100 µl standaardcolcemide (10 µg/ml) toe.
4. Sluit de buisjes met een dop af en meng de inhoud door de buisjes om te keren.
5. Incubeer de buisjes gedurende 20 minuten bij 37 °C.
6. Centrifugeer de buisjes na incubatie gedurende 8 minuten op 1200 omw/min (300 x g).
7. Aspireer het supernatant voorzichtig uit elk buisje.
8. Resuspendeer de celpellet door deze voorzichtig te mengen, of door met de wijsvinger tegen de onderkant van het buisje te tikken.
9. Voeg ZEER LANGZAAM aan elk buisje 10 ml hypotone oplossing (0,075 M kaliumchloride) toe, terwijl u het met de vortexmenger mengt (op de laagste stand).
10. Laat de buisjes gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur staan (hypotone behandeling).
11. Centrifugeer de buisjes gedurende 8 minuten op 1200 omw/min (300 x g).
12. Aspireer het supernatant en laat ca. 1,0 ml hypotone oplossing boven de celpellet staan.
 NB: 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.
13. Resuspendeer de celpellet zoals beschreven in stap 8.
14. Voeg ZEER LANGZAAM aan elk buisje 10 ml van de fixeeroplossing 3:1 methanol:azijnzuur toe, terwijl u het met de vortexmenger mengt (op de laagste stand).

15. Laat de buisjes gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur staan (eerste fixatie).
16. Herhaal stap 11 t/m 13.
17. Voeg 5 ml van de fixeeroplossing toe, zoals in stap 14.
18. Laat de buisjes gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur staan (tweede fixatie).
19. Herhaal stap 16 t/m 18 (derde fixatie).
20. Nu kunnen de gefixeerde celpellets direct worden gebruikt voor het prepareren van het objectglasje volgens het standaardprotocol van het laboratorium of in de koelkast (bij 2-8 °C) worden bewaard voor toekomstig gebruik.

BEWAREN EN STABILITEIT

Bewaar CHANG Medium BMC bevroren bij een temperatuur lager dan -10 °C tot het moment van gebruik. CHANG Medium BMC 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 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 BMC bevat FBS en GCT geconditioneerd medium en dient met inachtneming van universele voorzorgsmaatregelen voor laboratoria te worden behandeld. Het medium bevat een antibioticum (gentamicine) 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.

INDIKACE PRO POUŽITÍ

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

POPIS PROSTŘEDKU

CHANG Medium BMC je médium připravené k použití, které se skládá z média RPMI Medium 1640 s FBS, pufrům HEPES, L-glutaminem, kondicionovaným médiem Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium a gentamicin-sulfátem. CHANG Medium BMC bylo optimalizováno na podporu efektivního zachycení buněk a růstu buněk kostní dřeně k cytogenetické analýze. Před kultivací kostní dřeně není nutné přidávat žádné složky.

SLOŽKY

<u>Aminokyselina</u>	<u>Proteiny, hormony</u>	<u>Vitaminy</u>
Arginin	<u>a růstové faktory</u>	<u>a stopové prvky</u>
Asparagin	Fetální bovinní sérum (FBS)	Kyselina listová
Kyselina asparagová		Nikotinamid
Cystin	<u>Indikátor pH</u>	Riboflavin
Glutamin	Fenolová červeně	Thiamin
Kyselina glutamová		Kyselina pantothenová
Glycin	<u>Soli a ionty</u>	Kobalamin
Histidin	Chlorid sodný	Pyridoxin
Hydroxyprolin	Cholinchlorid	Kyselina aminobenzová
Isoleucin	Chlorid draselný	
Leucin	Síran hořečnatý	<u>Ostatní</u>
Lysin	Fosforečnan sodný	Kondicionané médium Giant Cell
Methionin	Dusičnan vápenatý	Tumor Conditioned Medium (GCT-CM)
Fenylalanin	<u>Pufry</u>	Glutathion
Prolin	Hydrogenuhlíčan sodný	Biotin
Serin	HEPES	
Threonin		<u>Antibiotikum</u>
Tryptofan		Gentamicin-sulfát
Tyrosin		<u>Energetické substráty</u>
Valin		Glukóza
		Inositol

Voda
V kvalitě vody pro injekci

POTŘEBNÉ NEDODÁVANÉ MATERIÁLY A VYBAVENÍ

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

ZAJIŠTĚNÍ KVALITY

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

PŘÍPRAVA K POUŽITÍ

CHANG Medium BMC je třeba rozmrazit přes noc v chladničce (2–8 °C) a potom jemným promícháním zajistit jeho homogenitu. Asepticky nadávkuje 10 ml média do sterilních kultivačních lahví a ekvilibrujete na 37 °C k okamžitému použití ke kultivaci kostní dřeně.

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

NÁVOD K POUŽITÍ

Příprava vzorku:

Použijte 0,5 až 1,0 ml aspirátu kostní dřeně s heparinem sodným. Heparin lišný, EDTA ani citrátová antikoagulační nejsou pro cytogenetická vyšetření vhodná.

- Pokud dostanete více než 5 ml aspirátu kostní dřeně, mohlo dojít k hemodiluci vzorku. Odstředěním izolujte fraksi kostní dřeně vzorku.
- Pokud vzorek dostanete v transportním médiu, odstředte ho a odstraňte transportní médium (supernatant). Inokulujte při použití zbývající frakce aspirátu.

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

Kultivace kostní dřeně:

Všechny kultivační nádoby označte jménem pacientky, číslem vzorku a typem kultury. Připravte pro každý vzorek kultivační lahev obsahující:

1. 10,0 ml CHANG Medium BMC.
2. Před inokulací vzorku lahev ekvilibrujte na 37 °C.
3. Každou lahev s obsahem 10,0 ml předem ekvilibrovaného média CHANG Medium BMC inokulujte 0,5 ml (500 µl) vzorku nebo jiným vhodným objemem v závislosti na počtu leukocytů. Přidejte méně vzorku, pokud je počet leukocytů vysoký (> 30 000), nebo více, pokud je počet leukocytů nízký (< 5 000).
4. Lahev inkubujte 1–2 dny při teplotě 37 °C.

Sběr kultur:

1. Vyjměte kultury z inkubátoru a jemným zakroužením resuspendujte buňky.
 2. Přeneste obsah kultivační lahve do 15ml centrifugační zkumavky.
 3. Do každé zkumavky přidejte 100 µl zásobního roztoku Colcemid (10 µg/ml).
 4. Zazátkujte zkumavky a promíchejte převrácením.
 5. Zkumavky inkubujte 20 minut při teplotě 37 °C.
 6. Po inkubaci zkumavky odstředte po dobu 8 minut na 1 200 ot./min. (300× g).
 7. Opatrně z každé zkumavky aspirujte supernatant.
 8. Resuspendujte buněčný pelet jemným promícháním nebo cvrnkáním ukazováčkem na dno zkumavky.
 9. VELMI POMALU přidejte 10 ml hypotonického roztoku (chlorid draselný 0,075 M) do každé zkumavky při vortexování (na nejnižší rychlost).
 10. Nechte zkumavky 20 minut odstát při pokojové teplotě (hypotonizace).
 11. Odstředte zkumavky po dobu 8 minut na 1 200 ot./min. (300× g).
 12. Aspirujte supernatant; ponechte přibližně 1,0 ml hypotonického roztoku na buněčném peletem.
- POZNÁMKA: 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.
13. Resuspendujte buněčný pelet podle popisu v kroku 8.
 14. VELMI POMALU přidejte 10 ml fixačního roztoku methanol : kyselina octová (3 : 1) do každé zkumavky při vortexování (na nejnižší rychlost).
 15. Nechte zkumavky 20 minut odstát při pokojové teplotě (první fixace).
 16. Opakujte kroky 11–13.
 17. Přidejte 5 ml fixačního roztoku jako v kroku 14.
 18. Nechte zkumavky 10 minut odstát při pokojové teplotě (druhá fixace).
 19. Opakujte kroky 16–18 (třetí fixace).
 20. V této chvíli lze fixované buněčné pelety ihned použít k přípravě sklíček podle standardního protokolu laboratoře nebo uložit do chladničky (2–8 °C) k budoucímu použití.

UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

CHANG Medium BMC je třeba do použití uchovávat při teplotě nižší než -10 °C. Pokud je skladováno zmrazené, CHANG Medium BMC je stabilní do data expirace uvedeného na štítku lahve. Po rozmrazení lze všechny nespotebované výrobky rozdělit na díly používané při zpracování a znovu zmrazit k pozdějšímu použití nebo pevně uzavřít a skladovat po dobu až 30 dní při teplotě 2 °C až 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 BMC obsahuje FBS a kondicionané médium GCT a je třeba s ním zacházet při dodržení všeobecných laboratorních bezpečnostních opatření. Médium obsahuje k omezení potenciálu bakteriální kontaminace antibiotikum (gentamicin), ale při dávkování média je vždy třeba používat aseptické techniky. Nepoužívejte žádné médium, které nemá červenou barvu.

INDIKATIONER FOR ANVENDELSE

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

BESKRIVELSE AF PRODUKTET

CHANG Medium BMC er et brugsklart medium, der består af RPMI Medium 1640 med FBS, HEPES-buffer, L-glutamin, kæmpecelletumor (Giant Cell Tumor, GCT) konditioneret medium og gentamicinsulfat. CHANG Medium BMC er blevet optimeret til at støtte effektiv cellevedhæftning og vækst af knoglemarvsceller til cytogenetisk analyse. Det er ikke nødvendigt at tilsætte andre komponenter inden dyrkning af knoglemarven.

KOMPONENTER

<u>Aminosyre</u>	<u>Proteiner, hormoner og vækstfaktorer</u>	<u>Vitaminer og sporelementer</u>
Arginin	Føtalt bovint serum (FBS)	Folinsyre
Asparagin		Nicotinamid
Asparaginsyre		Riboflavin
Cystin	<u>pH-indikator</u>	Thiamin
Glutamin	Rød fenol	Pantothenesyre
Glutaminsyre		Cobalamin
Glycin		Pyridoxin
Histidin	<u>Salte og ioner</u>	Paraaminobenzoesyre
Hydroxyprolin	Natriumklorid	
Isoleucin	Kolinklorid	<u>Andet</u>
Leucin	Kaliumklorid	Kæmpecelletumor konditioneret medium (Giant cell tumor conditioned medium, GCT-CM)
Lysin	Magnesiumsulfat	Glutathion
Methionin	Natriumfosfat	Biotin
Phenylalanin	Kalciumnitrat	
Prolin		<u>Energisubstrater</u>
Serin	<u>Buffere</u>	Glukose
Threonin	Natriumbikarbonat	Inositol
Tryptofan	HEPES	
Tyrosin		
Valin	<u>Antibiotikum</u>	
	Gentamicinsulfat	
<u>Vand</u>		
Af kvalitet til injektionsvæske		

NØDVENDIGE MATERIALER OG USTYR, DER IKKE MEDFØLGER

1. Sterile centrifugerør og dyrkningskolber af plastic
2. CO₂-inkubator på 37 °C
3. Bordcentrifuge
4. Vortexmixer
5. Colcemid-stamopløsning, 10 µg/ml
6. Kaliumkloridopløsning, 0,075 M
7. Fikseringsopløsning, methanol:eddikesyre (3:1)

KVALITETSSIKRING

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

KLARGØRING

CHANG Medium BMC skal tões op natten over i køleskab (2-8 °C) og derefter blandes forsigtigt for at sikre homogenitet. Dispenser 10 ml af mediet aseptisk ind i sterile dyrkningskolber, og ækvilibrer til 37 °C til øjeblikkelig anvendelse til knoglemarvskulturer.

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

BRUGSANVISNING

Prøveforberedelse:

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

- Hvis der modtages mere end 5 ml knoglemarvsaspirat, kan prøven være en hæmodilution. Centrifuger prøven ned for at isolere knoglemarvsfraktionen.
- Hvis prøven ankommer i transportmedium, centrifugeres prøven ned, og transportmediet (supernatant) fjernes. Resten af aspiratfraktionen indpodes.

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.

Knoglemarvskultur:

Marker alle dyrkningsbeholderne med patientnavn, prøvenummer og kulturtype. For hver prøve klargøres en kolbe med:

1. 10,0 ml CHANG Medium BMC.
2. Ækvilibrer kolben til 37 °C, inden prøven indpodes.
3. Indpod 0,5 ml (500 µl) af prøven, eller en passende mængde afhængigt af leukocytaltallet i hver kolbe, med 10,0 ml præ-ækvilibreret CHANG Medium BMC. Tilsæt mindre af prøven, hvis leukocytaltallet er højt (> 30.000) eller mere, hvis leukocytaltallet er lavt (< 5.000).
4. Inkuber kolben ved 37 °C i 1-2 dage.

Høst af kultureerne:

1. Tag kultureerne ud af inkubatoren, og hvirvl dem forsigtigt rundt for at resuspendere cellerne.
2. Overfør kolbens indhold til et 15 ml centrifugerør.
3. Tilsæt 100 µl Colcemid-stamopløsning (10 µg/ml) til hvert rør.
4. Sæt hætter på rørene, og bland dem ved at vende dem op og ned.
5. Inkuber rørene ved 37 °C i 20 minutter.
6. Efter inkubation centrifugeres rørene i 8 minutter ved 1200 o/min. (300 x g).
7. Aspirer forsigtigt supernatanten ud af hvert rør.
8. Resuspender cellepelleten ved forsigtig blanding eller ved at banke let på bunden af røret med pegefingeren.
9. Tilsæt MEGET LANGSOMT 10 ml hypotonisk opløsning (0,075 M kaliumklorid) til hvert rør, mens der vortexblandes (på laveste indstilling).
10. Lad rørene stå ved stuetemperatur i 20 minutter (hypotonisk behandling).
11. Centrifuger rørene i 8 minutter ved 1200 o/min. (300 x g).
12. Aspirer supernatanten, og efterlad ca. 1,0 ml hypotonisk opløsning over cellepelleten.
BEMÆRK: 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.
13. Resuspender cellepelleten, som beskrevet i trin 8.
14. Tilsæt MEGET LANGSOMT 10 ml methanol: eddikesyre (3:1) fikseringsvæske til hvert rør, mens der vortexblandes (på laveste indstilling).
15. Lad rørene stå ved stuetemperatur i 20 minutter (første fiksering).
16. Gentag trin 11-13.
17. Tilsæt 5 ml fiksering som i trin 14.
18. Lad rørene stå ved stuetemperatur i 10 minutter (anden fiksering).
19. Gentag trin 16-18 (tredje fiksering).
20. På dette tidspunkt kan de fikserede cellepellets straks anvendes til forberedelse af objektglas ifølge laboratoriets standardprotokol eller opbevares i køleskab (2-8 °C) til senere anvendelse.

OPBEVARING OG STABILITET

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

FORHOLDSREGLER OG ADVARSLER

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

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

KÄYTTÖAIHE

CHANG Medium BMC on tarkoitettu käytettäväksi ihmisen luuytimen kliinisten primaariviljelmien karyotyypin määrittämistä ja erilaisten hematologisten sairauksien muuta geneettistä testausta varten.

VÄLINEEN KUVAUS

CHANG Medium BMC on käyttövalmis liuos, joka sisältää RPMI Medium 1640 -elatusainetta ja naudan sikiön seerumia, HEPES-puskuria, L-glutamiinia, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium -liuosta ja gentamysiinisulfaattia. CHANG Medium BMC on optimoitu tukemaan tehokasta luuydinsolujen kiinnittymistä ja kasvua sytogeneettista analyysiä varten. Minkään ainesosan lisäämistä ennen luuytimen viljelyä ei tarvita.

AINESOSAT

<u>Aminohappo</u>	<u>Proteiinit, hormonit ja kasvutekijät</u>	<u>Vitamiinit ja hivenaineet</u>
arginiini	naudan sikiön seerumi (FBS)	foolihappo
asparagiini		nikotiiniamidi
asparagiinihappo		riboflaviini
kystiini		tiamiini
glutamiini	<u>pH-indikaattori</u>	panototeenihappo
glutamiinihappo	fenolipuna	kobalamiini
glysiini		pyridoksiini
histidiini	<u>Suolat ja ionit</u>	aminobentsoiinihappo
hydroksiprolini	natriumkloridi	
isoleusiini	koliinikloridi	<u>Muut</u>
leusiini	kaliumpkloridi	osteoklastooma-
lysiini	magnesiumsulfaatti	soluviljelmässä
metioniini	natriumfosfaatti	käytetty liuos
fenyylialaniini	kalsiumnitraatti	(GCT-CM)
proliini		glutitioni
seriini	<u>Puskurit</u>	biotiini
treoniini	natriumbikarbonaatti	
tryptofaani	HEPES	<u>Energiasubstraatit</u>
tyrosiini		glukoosi
valiini	<u>Antibiotti</u>	inositoli
	gentamysiinisulfaatti	

Vesi

injektionesteisiin tarkoitettua vettä laatuinen

TARVITTAVAT MATERIAALIT JA LAITTEISTOT, JOITA EI TOIMITETA MUKANA

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

LAADUNVARMENNUS

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

KÄYTÖN VALMISTELU

CHANG Medium BMC on sulatettava yön yli jääkaapissa (2–8 °C) ja sitten sekoitettava varovasti homogeenisen liuoksen takaamiseksi. Jaa aseptisesti 10 ml liuosta steriileihin viljelypulloihin ja anna tasapainottua 37 °C:seen välitöntä luuydinviljelmässä käyttämistä varten.

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

KÄYTTÖOHJEET

Näytteen valmistelu:

Käytä 0,5–1,0 ml natriumheparinisoitua luuydinaspiraattia. Litiumhepariini, EDTA tai sitraattiantikoagulantit eivät sovi sytogeneettisiin tutkimuksiin.

- Jos saadaan yli 5 ml luuydinaspiraattia, näyte saattaa olla laimentunut verellä. Sentrifugoi lyhyesti näyte pohjaan luuydinnäyteosan eristämiseksi.
- Jos näyte saapuu kuljetusliuoksessa, sentrifugoi lyhyesti näyte pohjaan ja poista kuljetusliuos (supernatantti). Siirrosta käyttäen jäljellä olevaa aspiraattiosaa.

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

Luuytimen viljely:

Merkitse kaikkiin viljelyastioihin potilaan nimi, näytenumero ja viljelystyyppi. Valmistele kutakin näytettä varten pullo, joka sisältää:

- 10,0 ml CHANG Medium BMC -liuosta.
- Tasapainota pullo 37 °C:seen ennen näytteen siirrostamista.
- Siirrosta 0,5 ml (500 µl) näytettä tai asianmukainen määrä, riippuen valkosolumäärästä (WBC), jokaiseen pulloon, jossa on 10,0 ml ennalta tasapainotettua CHANG Medium BMC -liuosta. Lisää vähemmän näytettä, jos WBC-määrä on suuri (> 30 000), tai enemmän näytettä, jos WBC-määrä on pieni (< 5 000).
- Inkuboi pulloa 37 °C:ssa 1–2 päivän ajan.

Viljelmien kerääminen:

- Ota viljelmät lämpökaapista ja uudelleensuspendoi solut varovasti pyörittämällä.
 - Siirrä pullon sisältö 15 ml:n sentrifugiputkeen.
 - Lisää 100 µl Colcemid-kantaliuosta (10 µg/ml) jokaiseen putkeen.
 - Sulje putket korkilla ja sekoita kääntelemällä.
 - Inkuboi putkia 37 °C:ssa 20 minuutin ajan.
 - Sentrifugoi putkia inkuboinnin jälkeen 8 minuuttia nopeudella 1 200 rpm (300 x g).
 - Aspiroi varovasti supernatantti kustakin putkesta.
 - Uudelleensuspendoi solupelletti varovasti sekoittamalla tai napsauttamalla putken pohjaa etusormella.
 - Lisää HYVIN HITAASTI 10 ml hypotonista liuosta (0,075 M kaliumpkloridia) kuhunkin putkeen, samalla kun sekoitat Vortexilla (pienin asetus).
 - Anna putkien olla paikallaan huoneenlämmössä 20 minuuttia (hypotoninen käsittely).
 - Sentrifugoi putkia 8 minuuttia nopeudella 1 200 rpm (300 x g).
 - Aspiroi supernatantti jättäen noin 1,0 ml hypotonista liuosta solupelletin yläpuolelle.
- HUOMAUTUS: Varo säikeistä materiaalia, joka voi ulottua solupelletistä ylös supernatanttiin sentrifugoinnin jälkeen. Supernatantin viimeiset muutamat millilitrat on ehkä poistettava käsin pasteuripipetillä (ei imuaspiraatiolla), jotta koko solupelletin imeminen jäteastian vältetään.
- Uudelleensuspendoi solupelletti vaiheessa 8 kuvatulla tavalla.
 - Lisää HYVIN HITAASTI 10 ml metanoli:etikahappofiksatiivia (3:1) kuhunkin putkeen, samalla kun sekoitat Vortexilla (pienin asetus).
 - Anna putkien olla paikallaan huoneenlämmössä 20 minuuttia (ensimmäinen fiksaus).
 - Toista vaiheet 11–13.
 - Lisää 5 ml fiksatiivia kuten vaiheessa 14.
 - Anna putkien olla paikallaan huoneenlämmössä 10 minuuttia (toinen fiksaus).

19. Toista vaiheet 16–18 (kolmas fiksaus).

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

SÄILYTTÄMINEN JA STABIILIUUS

CHANG Medium BMC on säilytettävä pakastettuna alle -10 °C:ssa, kunnes sitä tarvitaan käyttöön. CHANG Medium BMC -liuos on stabiilia pullon etikettiin merkittyyn viimeiseen käyttöpäivään saakka, kun liuosta säilytetään pakastettuna. Sulatuksen jälkeen käyttämätön liuos voidaan jakaa työskentelyeriin ja pakastaa uudelleen myöhempää käyttöä varten. Liuos säilyy tiukasti korkilla suljettuna ja 2–8 °C: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 BMC sisältää naudan sikiön seerumia ja GCT-solujen viljelyssä käytettyä elatusainetta, ja sitä on käsiteltävä laboratorion yleisiä varotoimia noudattaen. Liuos sisältää antibioottia (gentamysiini) bakteerikontaminaation mahdollisuuden vähentämiseksi, mutta liuosta jaettaessa on aina käytettävä aseptisiä menetelmiä. Älä käytä mitään liuosta, joka ei ole väriltään punaista.

LIETOŠANAS INDIKĀCIJA

„CHANG Medium BMC” (Čanga barotne BMC) ir paredzēta lietošanai klīnisko cilvēku kaulu smadzeņu kultūru primārajā kultivēšanā, lai veiktu kariotipu noteikšanu un citus ģenētiskos testus dažādu hematoloģisku traucējumu gadījumā.

IERĪCES APRAKSTS

„CHANG Medium BMC” ir lietošanai gatava barotne, kas sastāv no „RPMI Medium 1640” ar liellopu embriju serumu (FBS), HEPES bufera, L-glutamīna, gigantisko šūnu audzēja (GCT) šūnu iedarbībā kondicionētas barotnes un gentamicīna sulfāta. „CHANG Medium BMC” ir optimizēta, lai veicinātu efektīvu kaulu smadzeņu šūnu pievienošanu un augšanu citogēnētisku analīžu veikšanai. Pirms kaulu smadzeņu šūnu kultivēšanas nav nepieciešama citu sastāvdaļu pievienošana.

SASTĀVDAĻAS

<u>Aminoskābe</u>	<u>Proteīni, hormoni un augšanas faktori</u>	<u>Vitamīni un mikroelementi</u>
Arginīns	Liellopu embriju serums (<i>fetal bovine serum</i> – FBS)	Folijskābe
Asparagīns		Nikotīnamīds
Asparagīnskābe		Riboflavīns
Cistīns		Tiamīns
Glutamīns		Pantotēnskābe
Glutamīnskābe	<u>pH indikators</u>	Kobalamīns
Glicīns	Fenolsarkanais	Piridoksīns
Histiīns		Aminobenzoskābe
Hidroksiprolīns	<u>Sāļi un joni</u>	
Izoleicīns	Nātrija hlorīds	<u>Citas</u>
Leicīns	Holīna hlorīds	Gigantisko šūnu audzēja šūnu iedarbībā kondicionēta barotne (GCT-CM)
Lizīns	Kālija hlorīds	Glutācijas
Metionīns	Magnija sulfāts	Biotīns
Fenilalanīns	Nātrija fosfāts	
Prolīns	Kalcija nitrāts	<u>Enerģijas substrāti</u>
Serīns		Glikoze
Treonīns	<u>Buferi</u>	Inozīts
Triptofāns	Nātrija bikarbonāts	
Tirozīns	HEPES	
Valīns		
<u>Ūdens</u>	<u>Antibiotikas</u>	
Injekciju ūdens (WFI) kvalitāte	Gentamicīna sulfāts	

NEPIECIEŠAMIE, BET NEIETVERTIE MATERIĀLI

1. Sterili centrifūgas plastmasas stobriņi un kultūras flakoni
2. CO₂ inkubators, kura iekšējā temperatūra ir 37 °C
3. Laboratorijas galda centrifūga
4. Virpuļmaistītājs
5. Standartšķīdums „Colcemid” 10 µg/ml
6. Kālija hlorīda šķīdums 0,075 M
7. Fiksācijas šķīdums, metilspirts:etiķskābe (3:1)

KVALITĀTES NODROŠINĀŠANA

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

SAGATAVOŠANA LIETOŠANAI

„CHANG Medium BMC” pa nakti jāatstāj ledusskapī (2–8 °C) atkausēšanai, pēc tam uzmanīgi jāsamaisa, lai nodrošinātu viendabīgumu. Aseptiski dozējiet 10 ml barotnes sterilos kultūras flakonos un nostabilizējiet 37 °C temperatūrā tūlītējai izmantošanai kaulu smadzeņu kultūrās.

Piezīme: barotnē „CHANG Medium BMC” parasti veidojas kalcija karbonāta kristāli. Nav novērots, ka šie kristāli radītu jebkādu nevēlamu ietekmi uz produkta veikspēju.

LIETOŠANAS NORĀDĪJUMI

Parauga sagatavošana:

izmantojiet 0,5 līdz 1,0 ml ar nātriju heparinizēta kaulu smadzeņu aspirāta. Lietojiet heparīns, EDTA vai citrātus saturoši antikoagulanti nav piemēroti citogēnētiskiem pētījumiem.

- Ja saņemts vairāk nekā 5 ml smadzeņu aspirāta, paraugs var būt ar sašķidrinātām asinīm. Centrifugējiet paraugu, lai izolētu kaulu smadzeņu frakciju.
- Ja paraugs ticis piegādāts transportēšanas barotnē, centrifugējiet to un atdaliet transportēšanas barotni (supernatantu). Inokulējiet, izmantojot atlikušo aspirāta frakciju.

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

Kaulu smadzeņu kultūra

Marķējiet visus kultūras traukus ar pacienta vārdu, uzvārdu, parauga numuru un kultūras veidu. Katram paraugam sagatavojiet flakonu, kas satur tālāk norādīto.

1. 10,0 ml „CHANG Medium BMC”.
2. Pirms parauga inokulācijas stabilizējiet flakonu 37 °C temperatūrā.
3. Inokulējiet 0,5 ml (500 µl) parauga vai atbilstošu tā daudzumu atkarībā no balto asinsķermenīšu skaita katrā flakonā, kas satur 10,0 ml iepriekš stabilizētas „CHANG Medium BMC”. Pievienojiet mazāk parauga, ja ir liels balto asinsķermenīšu skaits (> 30 000), vai vairāk parauga, ja balto asinsķermenīšu skaits ir mazs (< 5000).
4. Inkubējiet flakonu 37 °C temperatūrā 1–2 dienas.

Kultivētā materiāla ievākšana

1. Izņemiet kultūras no inkubatora un uzmanīgi pavirpiniet to, lai atkārtoti suspendētu šūnas.
2. Pārnesiet flakona saturu uz 15 ml centrifūgas stobriņu.
3. Katra stobriņa saturam pievienojiet 100 µl standartšķīduma „Colcemid” (10 µg/ml).
4. Uzlieciet stobriņu aizbāžņus un samaisiet, apvēršot otrādi.
5. Inkubējiet stobriņus 37 °C temperatūrā 20 minūtes.
6. Pēc inkubācijas centrifugējiet stobriņus 8 minūtes ar ātrumu 1200 apgr./min (paātrinājums 300 x g).
7. Rūpīgi aspirējiet katru stobriņa supernatantu.
8. Atkārtoti suspendējiet šūnu lodīti, uzmanīgi maisot vai viegli piesitot stobriņa apakšdaļai ar rādītājpirkstu.
9. Kamēr stobriņi atrodas virpuļmaistītājā (lēnākajā iestatījumā), ĻOTI LĒNI pievienojiet katram stobriņam 10 ml hipotoniskā šķīduma (0,075 M nātrija hlorīda).
10. Atstājiet stobriņus istabas temperatūrā 20 minūtes (hipotoniska apstrāde).
11. Centrifugējiet stobriņus 8 minūtes ar ātrumu 1200 apgr./min (paātrinājums 300 x g).
12. Aspirējiet supernatantu, atstājot aptuveni 1,0 ml hipotoniskā šķīduma virs šūnu lodītes. PIEZĪME: uzmanieties, rīkojoties ar šķiedrainu materiālu, kas pēc centrifugēšanas no šūnu lodītes var iestiepties supernatantā. Pēdējos supernatanta ml var būt nepieciešams atdalīt manuāli ar Pastēra pipeti (nelietojot vakuuma aspirāciju), lai nepieļautu visas šūnu lodītes aspirēšanu atkritumu konteinerā.
13. Atkārtoti suspendējiet šūnu lodīti, kā aprakstīts 8. darbībā.
14. Kamēr stobriņi atrodas virpuļmaistītājā (lēnākajā iestatījumā), ĻOTI LĒNI pievienojiet katram stobriņam 10 ml 3:1 metilspirta:etiķskābes fiksācijas šķīduma.
15. Atstājiet stobriņus istabas temperatūrā 20 minūtes (pirmā fiksācija).

16. Atkārtojiet 11.–13. darbību.

17. Pievienojiet 5 ml fiksācijas šķīduma, kā minēts 14. darbībā.

18. Atstājiet stobriņus istabas temperatūrā 10 minūtes (otrā fiksācija).

19. Atkārtojiet 16.–18. darbību (trešā fiksācija).

20. Šobrīd fiksētās šūnu lodītes var lietot nekavējoties, lai saskaņā ar laboratorijas standarta protokolu sagatavotu priekšmetstiklīņus, vai glabāt ledusskapī (2–8 °C) vēlākai izmantošanai.

GLABĀŠANA UN STABILITĀTE

„CHANG Medium BMC” jāglabā sasaldēta par –10 °C zemākā temperatūrā, līdz tā ir gatava lietošanai. Glabājot sasaldēta veidā, „CHANG Medium BMC” saglabā stabilitāti līdz derīguma termiņam, kas norādīts uz pudeles etiķetes. Pēc atkausēšanas jebkādas neizlietotā produkta pārpalikums var dozēt darbā izmantojamās devās un atkārtoti sasaldēt vēlākai izmantošanai vai cieši noslēgtus glabāt no 2 °C līdz 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 BMC” satur liellopu embriju serumu (FBS) un gigantisko šūnu audzēja (GCT) šūnu iedarbībā kondicionētu barotni, tādēļ ar to jārīkojas, ievērojot vispārējos piesardzības pasākumus darbam laboratorijā. Barotne satur antibiotiku (gentamicīnu), lai samazinātu baktēriju kontaminācijas iespējamību, taču, dozējot barotni, vienmēr jāizmanto aseptiska tehnika. Nelietojiet barotni, ja tā nav sarkanā krāsā.

INDICAȚIE DE UTILIZARE

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

DESCRIEREA DISPOZITIVULUI

CHANG Medium BMC este un mediu gata pentru utilizare care constă în RPMI Medium 1640, cu FBS, tampon HEPES, L-glutamină, mediu condiționat pentru tumori cu celule gigant (GCT) și sulfat de gentamicină. CHANG Medium BMC a fost optimizat pentru a susține atașarea și creșterea eficientă a celulelor de măduvă osoasă pentru analiza citogenetică. Nu este necesară adăugarea niciunor alte componente înainte de cultivarea măduvei osoase.

COMPONENTE

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

MATERIALE ȘI APARATURĂ NECESARE, DAR NEFURNIZATE

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

ASIGURAREA CALITĂȚII

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

PREGĂTIREA PENTRU UTILIZARE

CHANG Medium BMC trebuie dezghețat peste noapte la frigider (2-8°C), apoi agitat ușor pentru asigurarea omogenității. Transferați aseptice 10 ml de mediu în vase de cultură sterile și echilibrați la 37°C pentru utilizare imediată pentru culturile de măduvă osoasă.

Notă: În CHANG Medium BMC 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

Pregătirea probei:

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

- Dacă s-au recoltat mai mult de 5 ml de aspirat de măduvă osoasă, proba poate fi hemodiluată. Centrifugați proba pentru a izola fracția de măduvă osoasă.
- Dacă proba sosește într-un mediu de transport, centrifugați proba și îndepărtați mediul de transport (supernatantul). Inoculați folosind restul fracției de aspirat.

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.

Cultivarea măduvei osoase:

Etichetați toate vasele de cultură cu numele pacientului, numărul probei și tipul de cultură. Pentru fiecare probă, pregătiți un vas care conține:

1. 10,0 ml CHANG Medium BMC.
2. Echilibrați flaconul la 37°C înainte de inocularea specimenului.
3. Inoculați 0,5 ml (500 µl) de probă sau cantitatea corespunzătoare în funcție de numărul de leucocite (WBC) în fiecare vas care conține 10,0 ml de CHANG Medium BMC pre-echilibrat. Adăugați mai puțină probă dacă numărul de leucocite este ridicat (> 30.000) sau mai multă probă dacă numărul de leucocite este scăzut (< 5.000).
4. Incubați vasul la 37°C timp de 1-2 zile.

Recoltarea culturilor:

1. Scoateți culturile din incubator și agitați ușor pentru a resuspenda celulele.
2. Transferați conținutul vasului într-o eprubetă de centrifugă de 15 ml.
3. Adăugați în fiecare eprubetă 100 µl de soluție stoc de Colcemid (10 µg/ml).
4. Astupați eprubetele și amestecați prin răsturnare.
5. Incubați eprubetele la 37°C timp de 20 de minute.
6. După incubare, centrifugați eprubetele timp de 8 minute la 1200 rpm (300 x g).
7. Aspirați cu atenție supernatantul din fiecare eprubetă.
8. Resuspendați peleta de celule prin amestecare ușoară sau prin lovirea ușoară a fundului eprubetei cu degetul arătător.
9. Adăugați FOARTE LENT 10 ml de soluție hipotonică (0,075 M clorură de potasiu) în fiecare eprubetă în timp ce agitați în agitatorul vortex (la cea mai redusă valoare).
10. Lăsați eprubetele să stea la temperatura camerei timp de 20 de minute (tratament hipotonic).
11. Centrifugați eprubetele timp de 8 minute la 1200 rpm (300 x g).
12. Aspirați supernatantul lăsând aproximativ 1,0 ml de soluție hipotonică deasupra peletei de celule. NOTĂ: Manifestați atenție 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.
13. Resuspendați peleta de celule așa cum se descrie la pasul 8.
14. Adăugați FOARTE LENT 10 ml de soluție de fixativ metanol:acid acetic 3:1 în fiecare eprubetă în timp ce agitați în agitatorul vortex (la cea mai redusă valoare).

15. Lăsați eprubetele să stea la temperatura camerei timp de 20 de minute (primul tratament).
16. Repetați pașii 11-13.
17. Adăugați 5 ml de soluție de fixativ ca la pasul 14.
18. Lăsați eprubetele să stea la temperatura camerei timp de 10 de minute (al doilea tratament).
19. Repetați pașii 16-18 (a treia fixare).
20. 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) pentru utilizare viitoare.

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

CHANG Medium BMC trebuie să fie depozitat congelat sub -10°C până când este gata de utilizare. CHANG Medium BMC 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 pentru utilizare ulterioară sau închis ermetic și depozitat la o temperatură între 2°C și 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 întrebuițarea pentru care a fost conceput dispozitivul.

CHANG Medium BMC conține mediu condiționat FBS și GCT și trebuie manipulat aplicând măsurile de precauție general valabile pentru practica de laborator. Mediul conține un antibiotic (gentamicină) pentru a se reduce potențialul de contaminare bacteriană, dar ar trebui folosite întotdeauna tehnici aseptice la transferarea mediului. Nu folosiți niciun mediu care nu are culoarea roșie.

SVENSKA

INDIKATIONER

CHANG Medium BMC är avsett för användning vid primärodlning av kliniska humana benmärgskulturer för karyotypbestämning och andra genetiska tester av olika hematologiska störningar.

PRODUKTBESKRIVNING

CHANG Medium BMC är ett medium som är färdigt att användas och består av RPMI Medium 1640 med FBS, HEPES-buffert, L-glutamin, GCT-konditionerat medium (Giant Cell Tumor) samt gentamicinsulfat. CHANG Medium BMC har optimerats för att främja effektiv vidhäftning och växt av benmärgsceller för cytogenetisk analys. Inga andra komponenter behöver tillsättas före odling av benmärg.

KOMPONENTER

Aminosyror	Proteiner, hormoner samt tillväxsfaktorer	Vitaminer och spårämnen
Arginin	Fetalt bovint serum (FBS)	Folsyra
Asparagin		Nikotinamid
Asparaginsyra		Riboflavin
Cystin		Tiamin
Glutamin		Pantotensyra
Glutaminsyra	pH-indikator	Kobalamin
Glycin	Fenolrött	Pyridoxin
Histidin		Aminobensoesyra
Hydroxiprolin	Salter och joner	
Isoleucin	Natriumklorid	Övrigt
Leucin	Kolinklorid	GCT-konditionerat medium (Giant cell tumor, GCT-CM)
Lysin	Kaliumklorid	Glutation
Metionin	Magnesiumsulfat	Biotin
Fenylalanin	Natriumfosfat	
Prolin	Kalciumnitrat	
Serin		
Treonin	Bufferter	Energisubstrat
Tryptofan	Natriumbikarbonat	Glukos
Tyrosin	HEPES	Inositol
Valin		
	Antibiotikum	
	Gentamicinsulfat	
Vatten		
Vatten för injektion (WFI)		

MATERIAL OCH UTRUSTNING SOM KRÄVS MEN INTE MEDFÖLJER

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

KVALITETSSÄKRING

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

BEREDNING FÖR ANVÄNDNING

CHANG Medium BMC bör tinas över natten i kylskåp (2–8 °C) och därefter blandas försiktigt för att säkerställa att det är homogent. Dispensera aseptiskt 10 ml medium i sterila odlingsflaskor och ekvilibra till 37 °C för omedelbar användning till benmärgsodling.

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

BRUKSANVISNING

Provberedning:

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

- Om mer än 5 ml benmärgsaspirat erhålls kan provet vara uppblandat med blod. Centrifugera ned provet för att isolera benmärgsfractionen.
- Om provet anländer i transportmedium, centrifugera ned provet och avlägsna transportmediet (supernatanten). Använd den kvarvarande aspiratfraktionen för utsädd.

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

Benmärgsodling:

Märk alla odlingskärl med patientens namn, provnummer och typ av kultur. För varje prov, bered en flaska innehållande:

1. 10,0 ml CHANG Medium BMC.
2. Ekvilibra flaskan till 37 °C före utsädd av provet.
3. Använd 0,5 ml (500 µl) prov eller lämplig volym beroende på leukocyttallet, till utsädd av celler i varje flaska innehållande 10,0 ml förekvilibrerat CHANG Medium BMC. Använd en mindre provvolym vid högt leukocyttal (> 30 000) och större provvolym vid lågt leukocyttal (< 5 000).
4. Inkubera flaskan vid 37 °C i 1–2 dagar.

Skörda kulturerna:

1. Ta ut kulturerna ur inkubatorn och snurra dem försiktigt så att cellerna resuspenderas.
2. Överför flaskans innehåll till ett 15 ml centrifugrör.
3. Tillsätt 100 µl Colcemid-stamlösning (10 µg/ml) till varje rör.
4. Förslut rören och blanda genom vändning.
5. Inkubera rören vid 37 °C i 20 minuter.
6. Centrifugera rören efter inkuberingen i 8 minuter vid 1 200 rpm (300 g).
7. Aspirera supernatanten försiktigt från varje rör.
8. Resuspendera cellpelleten genom att blanda försiktigt eller genom att knäppa på rørets botten med pekfingeret.
9. Tillsätt MYCKET LÅNGSAMT 10 ml hypoton lösning (0,075 M kaliumklorid) till varje rör under vortexblandning (på lägsta inställningen).
10. Låt rören stå i rumstemperatur i 20 minuter (hypoton behandling).
11. Centrifugera rören i 8 minuter vid 1 200 rpm (300 g).
12. Aspirera supernatanten men lämna kvar cirka 1,0 ml hypoton lösning ovanför cellpelleten.
ANM: 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.
13. Resuspendera cellpelleten enligt beskrivningen i steg 8.
14. Tillsätt MYCKET LÅNGSAMT 10 ml fixeringslösning med 3:1 metanol:ättiksyra till varje rör under vortexblandning (på lägsta inställningen).
15. Låt rören stå i rumstemperatur i 20 minuter (första fixeringen).
16. Upprepa steg 11–13.
17. Tillsätt 5 ml fixeringslösning som i steg 14.
18. Låt rören stå i rumstemperatur i 10 minuter (andra fixeringen).
19. Upprepa steg 16–18 (tredje fixeringen).
20. De fixerade cellpellets kan nu antingen användas omedelbart för beredning av objektglas enligt laboratoriets standardförfarande eller förvaras i kylskåp (2–8 °C) för senare användning.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

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

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

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

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

PRZEZNACZENIE

Pożywka CHANG Medium BMC jest przeznaczona do użytku do hodowli pierwotnej próbek klinicznych ludzkiego szpiku kostnego do kariotypowania i innych testów genetycznych na różne schorzenia hematologiczne.

OPIS WYROBU

Produkt CHANG Medium BMC to pożywka gotowa do użycia, w której skład wchodzi pożywka RPMI Medium 1640 z FBS, bufor HEPES, L-glutamina, pożywka Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium i siarczan gentamycyny. Pożywkę CHANG Medium BMC zoptymalizowano pod kątem wydajnego przyłączania komórek i wzrostu komórek szpiku kostnego do analizy cytogenetycznej. Przed założeniem hodowli szpiku kostnego nie jest konieczne dodawanie żadnych dodatkowych składników.

SKŁADNIKI

<u>Aminokwasy</u>	<u>Białka, hormony i czynniki wzrostu</u>	<u>Witaminy i pierwiastki śladowe</u>
Arginina	Plodowa surowica bydłowa (FBS)	Kwas foliowy
Asparagina		Nikotynamid
Kwas asparaginowy		Ryboflawina
Cystyna		Tiamina
Glutamina	<u>Wskaźnik pH</u>	Kwas pantotenowy
Kwas glutaminowy	Czerwień fenolowa	Kobalamina
Glicyna		Pirydoksyna
Histydyna	<u>Sole i jony</u>	Kwas aminobenzoesowy
Hydroksyprolina	Chlorek sodu	
Izoleucyna	Chlorek choliny	
Leucyna	Chlorek potasu	
Lizyna	Siarczan magnezu	<u>Inne</u>
Metionina	Fosforan sodu	Pożywka Giant cell tumor conditioned medium (GCT-CM)
Fenylalanina	Azotan wapnia	Glutation
Prolina		Biotyna
Seryna	<u>Bufory</u>	
Treonina	Wodorowęglan sodu	
Tryptofan	HEPES	<u>Substraty energetyczne</u>
Tyrozyna		Glukoza
Walina	<u>Antybiotyki</u>	Inozytol
	Siarczan gentamycyny	

Woda

Woda o jakości WFI

MATERIAŁY I WYPOSAŻENIE WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

1. Sterylne, wykonane z tworzywa sztucznego probówki wirówkowe i butelki hodowlane
2. Inkubator z atmosferą CO₂ nastawiony na temperaturę 37°C
3. Wirówka laboratoryjna
4. Wytrząsarka
5. Roztwór podstawowy kolcemicdu, 10 µg/ml
6. Roztwór chlorku potasu, 0,075 M
7. Roztwór utrwalający, metanol:kwas octowy (3:1)

ZAPEWNIANIE JAKOŚCI

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

PRZYGOTOWANIE DO UŻYCIA

Pożywkę CHANG Medium BMC należy rozmrażać 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 do hodowli szpiku kostnego.

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

INSTRUKCJA UŻYCIA

Przygotowanie próbki:

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

- Jeśli uzyskano więcej niż 5 ml aspiratu szpiku kostnego, próbka może być rozcieńczona krwią. Odwirować próbkę, aby oddzielić frakcję szpiku kostnego.
- Jeśli próbkę dostarczono w pożywce transportowej, odwirować ją i usunąć pożywkę transportową (nadsącz). Posiać komórki, używając pozostałej frakcji aspiratu.

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

Hodowla komórek szpiku kostnego:

Opisać wszystkie naczynia hodowlane imieniem i nazwiskiem pacjenta, numerem próbki i typem hodowli. Dla każdej próbki przygotować butelkę zawierającą:

1. 10,0 ml pożywki CHANG Medium BMC.
2. Przed posiewem próbki zrównoważyć butelkę do temperatury 37°C.
3. Posiać 0,5 ml (500 µl) próbki lub odpowiednią objętość próbki w zależności od liczby białych krwinek (WBC) do każdej butelki zawierającej 10,0 ml wstępnie zrównoważonej pożywki CHANG Medium BMC. Jeśli liczba WBC jest wysoka (>30 000), dodać mniejszą objętość próbki, a jeśli liczba WBC jest niska (<5000), dodać większą objętość próbki.
4. Inkubować butelkę w temperaturze 37°C przez 1–2 dni.

Zbiór hodowli:

1. Wyciągnąć hodowle z inkubatora i delikatnie obracać butelkę ruchem wirowym, aby zawiesić komórki.
2. Przenieść zawartość butelki do probówki wirówkowej o pojemności 15 ml.
3. Dodać po 100 µl roztworu podstawowego kolcemicdu (10 µg/ml) do każdej probówki.
4. Zamknąć probówki i wymieszać, odwracając.
5. Inkubować probówki w temperaturze 37°C przez 20 minut.
6. Po inkubacji wirować probówki przez 8 minut przy 1200 rpm (300 x g).
7. Ostrożnie zaaspirować nadsącz z każdej probówki.
8. Zawiesić osad komórkowy, delikatnie mieszając lub ostukując dno probówki palcem wskazującym.
9. BARDZO POWOLI dodać 10 ml roztworu hipotonicznego (chlorek potasu w stężeniu 0,075 M) do każdej probówki, wytrząsając ją (przy najniższym ustawieniu wytrząsarki).
10. Pozostawić probówki na 20 minut w temperaturze pokojowej (poddawanie działaniu roztworu hipotonicznego).
11. Wirować probówki przez 8 minut przy 1200 rpm (300 x g).
12. Zaaspirować nadsącz, pozostawiając około 1,0 ml roztworu hipotonicznego nad osadem komórkowym. UWAGA: Należy uważać na materiał włóknisty, który po odwirowaniu może wystawać z osadu komórkowego do nadsącza. Aby uniknąć zaaspirowania całego osadu komórkowego do zbiornika na odpady, może być konieczne ręczne usunięcie ostatnich kilku ml nadsącza za pomocą pipety Pasteura (nie korzystając z aspiracji próżniowej).
13. Zawiesić osad komórkowy zgodnie z opisem w kroku 8.
14. BARDZO POWOLI dodać 10 ml roztworu utrwalającego, metanol:kwas octowy w stosunku 3:1, do każdej probówki, wytrząsając ją (przy najniższym ustawieniu wytrząsarki).
15. Pozostawić probówki na 20 minut w temperaturze pokojowej (pierwsze utrwalenie).

16. Powtórzyć kroki 11–13.

17. Dodać 5 ml roztworu utrwalającego zgodnie z opisem w kroku 14.

18. Pozostawić probówki na 10 minut w temperaturze pokojowej (drugie utrwalenie).

19. Powtórzyć kroki 16–18 (trzecie utrwalenie).

20. 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) do późniejszego użycia.

PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ

Pożywkę CHANG Medium BMC należy przechowywać zamrożoną w temperaturze poniżej –10°C do czasu użycia. Pożywka zachowuje stabilność do upływu terminu ważności podanego na etykiecie butelki, jeśli jest przechowywana w stanie zamrożonym. Po rozmrożeniu nieużyty produkt można rozdzielić na porcje robocze i zamrozić ponownie do późniejszego użycia 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 BMC zawiera FBS i pożywkę GCT-CM i należy z nią postępować, przestrzegając standardowych środków ostrożności obowiązujących w laboratorium. Aby zmniejszyć ryzyko zanieczyszczenia bakteryjnego, pożywka zawiera antybiotyki (gentamycynę). Podczas rozdzielania pożywki należy jednak zawsze stosować techniki aseptyczne. Nie używać pożywki, która nie ma czerwonego koloru.

NÄIDUSTUS KASUTAMISEKS

CHANG Medium BMC on mõeldud kasutamiseks primaarsetes kliinilistes inimese luuüdi kultuurides kariotüüpimise ja muude geneetiliste, erinevate hematoloogiliste häirete testimise eesmärgil.

SEADME KIRJELDUS

CHANG Medium BMC on kasutusvalmis sööde, mis koosneb RPMI Medium 1640 FBS-ist ja sisaldab HEPES-puhvrit, L-glutamiini, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Mediumi ja gentamitsiinsulfaati. CHANG Medium BMC on optimeeritud toetama luuüdi rakkude efektiivset kinnitumist ja kasvu tsütogeneetilise analüüsi eesmärgil. Enne luuüdi kultuurimist ei ole vaja lisada muid komponente.

OSAD

<u>Aminohape</u>	<u>Valgud, hormoonid ja kasvufaktorid</u>	<u>Vitamiinid ja mikroelemendid</u>
Arginiin	Veiseloote päritolu seerum (FBS)	Foolhape
Asparagiin		Nikotiinamiid
Asparagiinhape		Riboflaviin
Tsüstiin		Tiamiin
Glutamiin	<u>pH-indikaator</u>	Pantoteenhape
Glutamiinhape	Fenoolpunane	Kobalamiin
Glütsiin		Püridoksiin
Histidiin	<u>Soolad ja ioonid</u>	Aminobensoehape
Hüdroksüproliin	Naatriumkloriid	
Isoleutsiin	Koliinkloriid	
Leutsiin	Kaaliiumkloriid	<u>Muu</u>
Lüsiin	Magneesiumsulfaat	Hiidrakulise kasvaja põhine sööde (GCT-CM)
Metioniin	Naatriumfosfaat	Glutatioon
Fenüülalaniin	Kaltsiumnitraat	Biotiin
Proliin		
Seriin	<u>Puhvrid</u>	
Treoniin	Naatriumvesinikkarbonaat	<u>Energia</u>
Trüptofaan	HEPES	<u>substraadid</u>
Türosiin		Glükoos
Valiin		Inositol
	<u>Antibiootikum</u>	
	Gentamitsiinsulfaat	

Vesi
WFI kvaliteet

VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID JA VAHENDID

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

KVALITEEDI TAGAMINE

Saavutatavat tulemust võivad mõjutada mitmed tegurid, sh proovide 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 BMC partii jõudlust on testitud kliinilistel luuüdikultuuridel sõltumatus kliinilises tsütogeneetikalaboris ja võrreldud kontrollsöötmelega. Tulemused on esitatud partiispetsiifilises analüüsertifikaadis.

ETTEVALMISTUSED KASUTAMISEKS

CHANG Medium BMC tuleb üles sulatada üleöö külmkapis (2–8 °C) ja seejärel homogeenuse tagamiseks õrnalt segada. Viige aseptilist tehnikat kasutades 10 ml söödet steriilsetesse kultuuripudelitesse ning tasakaalustage temperatuuril 37 °C koheseks kasutamiseks luuüdi kultuuridega.

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

KASUTUSJUHEND

Proovi ettevalmistamine

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

- Üle 5 ml luuüdi aspiraadi puhul võib olla tegu hemodilutsiooniga. Luuüdi fraktsiooni isoleerimiseks kasutage tsentrifuugi.
- Kui proov tuleb transportainesse, siis tsentrifuugige seda ja eemaldage transportaine (supernatant). Inokuleerige allesjäänud aspiraadifraktsiooni kasutades.

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

Luuüdi kultuur

Sildistage kõik kultuurianumad patsiendi nime, proovi numbriga ja kultuuri tüübiga. Iga proovi jaoks valmistage ette kultuuripudel, mis sisaldab:

1. 10,0 ml CHANG Medium BMC.
2. Enne proovi inokuleerimist tasakaalustage pudel temperatuurile 37 °C.
3. Inokuleerige 0,5 ml (500 µl) proovi või sobiv kogus olenevalt valgete vereliblede (WBC) arvust igasse rakupudelisse, mis sisaldab 10,0 ml eeltasakaalustatud toodet CHANG Medium BMC. Lisage vähem proovi, kui WBC on kõrge (> 30 000), ja rohkem proovi, kui WBC on madal (< 5000).
4. Inkubeerige rakupudelit temperatuuril 37 °C 1–2 päeva.

Kultuuride kogumine

1. Eemaldage kultuurid inkubaatorist ja segage rakkude suspendeerimiseks õrnalt.
 2. Viige rakupudeli sisu üle 15 ml tsentrifuugikatsutisse.
 3. Lisage igasse katsutisse 100 µl toodet Colcemid (10 µg/ml).
 4. Korkige katsutid ja segage ringkeeramise teel.
 5. Inkubeerige katsuteid temperatuuril 37 °C 20 minutit.
 6. Pärast inkubeerimist tsentrifuugige katsuteid 8 minutit 1200 p/min (300 × g).
 7. Aspireerige igast katsutist ettevaatlikult supernatant.
 8. Resuspendeerige rakupellet õrnalt segades või nipsake nimetissõrmega vastu katsuti põhja.
 9. Lisage igasse katsutisse VÄGA AEGLASELT 10 ml hüpotoonilist lahust (0,075 M kaaliiumkloriid), samal ajal Vortex-segades (väikseimal kiirusel).
 10. Laske katsutil seista toatemperatuuril 20 minutit (hüpotooniline töötus).
 11. Tsentrifugeerige katsuteid 8 minutit 1200 p/min (300 × g).
 12. Aspireerige supernatant, jättes rakupelleti peale umbes 1,0 ml hüpotoonilist lahust.
- MÄRKUS. 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.
13. Resuspendeerige rakupelletit, nagu on kirjeldatud sammus 8.
 14. Lisage igasse katsutisse VÄGA AEGLASELT 10 ml metanooli-äädikhappe kinnitit suhtega 3 : 1, samal ajal Vortex-segades (väikseimal kiirusel).
 15. Laske katsutil seista toatemperatuuril 20 minutit (esimene kinnitamine).
 16. Korrake samme 11–13.
 17. Lisage 5 ml kinnitit, nagu sammus 14.
 18. Laske katsutil seista toatemperatuuril 10 minutit (teine kinnitamine).
 19. Korrake samme 16–18 (kolmas kinnitamine).
 20. Nüüd võib kinnitatud rakupelletideid kasutada kohe slaidi ettevalmistamiseks labori standardprotseduuride kohaselt või säilitada külmkapis (2–8 °C) tulevaseks kasutamiseks.

SÄILITAMINE JA STABIILSUS

CHANG Medium BMC tuleb hoida külmutatult temperatuuril –10 °C kuni kasutamiseni. CHANG Medium BMC on juhistikohasel säilitamisel stabiilne pudeli etiketile märgitud kuupäevani. Pärast sulatamist võib kasutamata toote jagada tööalikkvoodidesse ja külmutada uuesti hilisemaks kasutamiseks või tihedalt korkida ja hoida temperatuuril 2–8 °C kuni 30 päeva. Kaitske fluorestentsvalguse eest.

ETTEVAATUSABINÕUD JA HOIATUSED

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

CHANG Medium BMC sisaldab FBS ja GCT põhist söödet ning seda tuleb käidelda tavapäraste laboratoorsete ettevaatusabinõudega. Sööde sisaldab antibiootikumi (gentamitsiini), et vähendada bakteriaalse saaste võimalust, kuid söötme jaotamisel tuleb alati rakendada aseptilist tehnikat. Ärge kasutage ühtki söödet, mis ei ole punast värvi.

FELHASZNÁLÁSI JAVALLATOK

A CHANG Medium BMC klinikai humán csontvelőtenyészetek elsődleges tenyésztésében való alkalmazásra szolgál, kariotípus meghatározásához és más genetikai vizsgálatokhoz különböző hematológiai rendellenességek esetén.

TERMÉKISMERTETÉS

A CHANG Medium BMC egy használatra kész médium, amely FBS-t, HEPES-puffert, L-glutamint, óriássejtes tumor (giant cell tumor, GCT) kondicionált médiumot és gentamicin-szulfátot tartalmazó RPMI Medium 1640-ból áll. A CHANG Medium BMC médiumot úgy optimalizálták, hogy támogassa a csontvelősejtek hatékony sejtkapcsolódását és növekedését a citogenetikai elemzéshez. A csontvelő tenyésztése előtt semmilyen összetevő hozzáadása nem szükséges.

ÖSSZETEVŐK

<u>Aminosav</u>	<u>Fehérjék,</u>	<u>Vitaminok és</u>
Arginin	<u>hormonok és</u>	<u>nyomelemek</u>
Aszparagin	<u>növekedési</u>	Folsav
Aszparaginsav	<u>faktorkok</u>	Nikotinamid
Cisztin	Magzati	Riboflavin
Glutamin	szarvasmarha	Tiamin
Glutaminsav	szérum (fetal	Pantoténsav
Glicin	bovine serum,	Kobalamin
Hisztidin	FBS)	Piridoxin
Hidroxi-prolin		Aminobenzoészav
Izoleucin	<u>pH-indikátor</u>	
Leucin	Fenolvörös	<u>Egyéb</u>
Lizin		Óriássejtes tumor
Metionin	<u>Sók és ionok</u>	kondicionált
Fenilalanin	Nátrium-klorid	médium (giant cell
Prolin	Kolin-klorid	tumor conditioned
Szerin	Kálium-klorid	medium, GCT-CM)
Treonin	Magnézium-szulfát	Glutacion
Triptofán	Nátrium-foszfát	Biotin
Tirozin	Kalcium-nitrát	
Valin		<u>Energias-</u>
	<u>Pufferek</u>	<u>zubsztrátok</u>
<u>Víz</u>	Nátrium-bikarbonát	Glükóz
Injekcióhoz való	HEPES	Inozitol
minőségű víz		
	<u>Antibiotikum</u>	
	Gentamicin-szulfát	

SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK ÉS FELSZERELÉS

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

MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS

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

ELŐKÉSZÍTÉS A FELHASZNÁLÁSRA

A CHANG Medium BMC médiumot 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 a csontvelőtenyészetekhez történő azonnali felhasználáshoz.

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

HASZNÁLATI UTASÍTÁS

Minta-előkészítés:

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

- Ha 5 ml-nél több csontvelő-aspirátumot kap, lehet, hogy a minta hemodilúált. Pörgesse le a mintát a csontvelőfrakció izolálásához.
- Ha a minta transzportmédiumban érkezik, pörgesse le a mintát és távolítsa el a transzportmédiumot (felülúszó). Végezze el az inokulációt a maradék aspirációs frakcióval.

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

Csontvelőtenyészet:

Feliratozza az összes tenyésztőedényt a beteg nevével, a mintaszámmal és a tenyészet típusával. Minden egyes mintához készítsen elő egy flaskát, amely a következőket tartalmazza:

1. 10,0 ml CHANG Medium BMC.
2. Ekvilibrálja a flaskát 37 °C-ra a minta inokulációja előtt.
3. Minden egyes előzetesen ekvilibrált, 10,0 ml CHANG Medium BMC médiumot tartalmazó flaskához adjon 0,5 ml (500 µl) mintát vagy a megfelelő mennyiséget a fehérvérsejtek számától (white blood cell, WBC) függően. Kevesebb mintát adjon hozzá, ha a WBC magas (> 30 000), illetve több mintát, ha a WBC alacsony (< 5000).
4. Inkubálja a flaskát 37 °C-on 1–2 napig.

A tenyészetek összegyűjtése:

1. Vegye ki a tenyészeteket az inkubátorból, és óvatosan forgassa a sejtek újbóli felszuszpendálásához.
2. Tegye át a flaska tartalmát egy 15 ml-es centrifugacsöbe.
3. Mindegyik csőhöz adjon 100 µl kolcemid törzsoldatot (10 µg/ml).
4. Zárja le a csöveket, és keverje össze azokat a csövek fel-le fordításával.
5. Inkubálja a csöveket 37 °C-on 20 percig.
6. Az inkubálás után centrifugálja a csöveket 8 percig 1200 rpm-en (300 × g).
7. Óvatosan szívja le a felülúszót az egyes csövekből.
8. Szuszpendálja fel újra a sejt pelletet óvatosan összekeverve vagy mutatóujjal megpöccintve a cső alját.
9. NAGYON LASSAN adjon 10 ml hipotóniás oldatot (0,075 M kálium-klorid) minden csőhöz (a legalacsonyabb értéken végzett) vortexelés közben.
10. Hagyja a csöveket szobahőmérsékleten 20 percig állni (hipotóniás kezelés).
11. Centrifugálja a csöveket 8 percig 1200 rpm-en (300 × g).
12. Szívja le a felülúszót, körülbelül 1,0 ml hipotóniás oldatot hagyva a sejt pelletet felett.
MEGJEGYZÉS: Ügyeljen a szálas anyagra, amely a centrifugálás után a sejt pelletből a felülúszóba kerülhet. Lehet, hogy az utolsó néhány ml felülúszót kézzel kell eltávolítani egy Pasteur-pipettával (nem vákuumszívással) a teljes sejt pellet hulladéktartályba szivásának elkerülése érdekében.
13. Szuszpendálja fel újra a sejt pelletet a 8. lépésben leírtak szerint.
14. NAGYON LASSAN adjon 10 ml 3:1 arányú metanol:ecetsav fixálószert minden csőhöz (a legalacsonyabb értéken végzett) vortexelés közben.

15. Hagyja a csöveket szobahőmérsékleten 20 percig állni (első fixálás).
16. Ismétlje meg a 11–13. lépést.
17. Adjon hozzá 5 ml fixálószert, ahogy a 14. lépésben.
18. Hagyja a csöveket szobahőmérsékleten 10 percig állni (második fixálás).
19. Ismétlje meg a 16–18. lépést (harmadik fixálás).
20. Ekkor a fixált sejt pelletek azonnal felhasználhatók metszetkészítéshez a laboratórium standard protokollja szerint, vagy hűtőszekrényben (2 és 8 °C között) tárolhatók későbbi felhasználásra.

TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

A CHANG Medium BMC médiumot fagyaszta, –10 °C alatt kell tárolni a felhasználásig. A CHANG Medium BMC stabil az üveg címkéjén feltüntetett lejáratú időpontig, amennyiben fagyaszta tárolják. A felolvasztást követően a fel nem használt termék munkaalkotokra cserélhető, és későbbi használatra újra lefagyasztható, vagy szorosan lezárva 2 és 8 °C közötti hőmérsékleten, legfeljebb 30 napig tárolható. Védje a fluoreszcens fénytől.

ÖVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK

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

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

NAUDOJIMO INDIKACIJA

„CHANG Medium BMC“ terpė yra skirta pirminėms klinikinėms žmogaus kaulų čiulpų ląstelių kultūroms auginti atliekant kariotipavimo ir kitus genetinius hematologinių patologijų tyrimus.

ITAISO APRAŠYMAS

„CHANG Medium BMC“ yra paruošta naudoti terpė, kurios sudėtyje yra RPMI 1640 terpės su FBS, HEPES buferinio tirpalo, L-glutamino, kondicionuotos terpės iš gigantinių ląstelių naviko (GCT) linijos ir gentamicino sulfato. „CHANG Medium BMC“ terpė yra optimizuota palaikyti veiksmingą kaulų čiulpų ląstelių prisitvirtinimą ir augimą kultivuojant citogenetinių tyrimų kultūras. Prieš kultivuojant kaulų čiulpų pasėlius, nereikia pridėti jokių kitų sudėtinųjų medžiagų.

SUEDAMOSIOS DALYS

<u>Aminorūgštis</u>	<u>Baltymai, hormonai ir augimo faktoriai</u>	<u>Vitaminai ir mikroelementai</u>
Argininas	Jaučio embriono kraujo serumas (FBS)	Folio rūgštis
Asparaginas		Nikotinamidas
Asparto rūgštis		Riboflavinas
Cistinas		Tiaminas
Glutaminas		Pantotėninė rūgštis
Glutamo rūgštis	<u>pH indikatorius</u>	Kobalaminas
Glicinas	Fenolio raudonas	Piridoksinas
Histidinas		Aminobenzoinė rūgštis
Hidroksiprolinas	<u>Druskos ir jonai</u>	<u>Kita</u>
Izoleucinas	Natrio chloridas	Kondicionuota terpė iš gigantinių ląstelių naviko (GCT-CM) linijos
Leucinas	Cholino chloridas	Glutacionas
Lizinas	Kalio chloridas	Biotinas
Metioninas	Magnio sulfatas	
Fenilalaninas	Natrio fosfatas	<u>Energetiniai substratai</u>
Prolinas	Kalcio nitratas	Gliukozė
Serinas		Inozitolis
Treoninas	<u>Buferiai</u>	
Triptofanas	Natrio bikarbonatas	
Tirozinas	HEPES	
Valinas		
	<u>Antibiotikas</u>	
	Gentamicino sulfatas	
<u>Vanduo</u>		
Injekcinio vandens kokybė		

REIKALINGOS, BET PAKUOTĖJE NEPATEIKTOS MEDŽIAGOS IR ĮRANGA

1. Sterilūs plastikiniai centrifuginiai mėgintuvėliai ir kultivavimo flakonai
2. CO₂ inkubatorius, 37 °C
3. Stalinė centrifuga
4. Sūkurinė maišyklė
5. Kolcemo pradinis tirpalas, 10 µg/ml
6. Kalio chlorido tirpalas, 0,075 M
7. Fiksatyvo tirpalas, metanolis: acto rūgštis (3:1)

KOKYBĖS UŽTIKRINIMAS

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

PARUOŠIMAS NAUDOTI

„CHANG Medium BMC“ terpė reikia per naktį atitirpinti šaldytuve (2 °C–8 °C), po to atsargiai sumaišyti iki vienalytės konsistencijos. Laikydami aseptikos reikalavimų, po 10 ml terpės supilstykite į sterilius kultivavimo flakonus ir, nusistovėjus iki 37 °C būsenos, tuoj pat naudokite kaulų čiulpų ląstelių kultūroms.

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

NAUDOJIMO NURODYMAI

Mėginių ruošimas

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

- Jei paimta daugiau kaip 5 ml kaulų čiulpų aspirato, mėginys gali būti paveiktas hemodilucijos. Mėginį centrifuguokite atskirdami kaulų čiulpų frakciją.
- Jei mėginys pristatomas transportavimo terpėje, mėginį centrifuguokite ir nusiurbkite transportinę terpę (supernatantą). Likusią aspirato frakciją naudokite kultūrai sėti.

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.

Kaulų čiulpų ląstelių kultūra

Ant visų kultivavimo indų pažymėkite paciento pavardę, mėginio numerį ir kultūros tipą. Kiekvienam mėginiui paruoškite po flakoną, kuriame yra:

1. 10,0 ml „CHANG Medium BMC“ terpės.
2. Prieš užsėdami mėginio kultūrą, pasiekite, kad nusistovėtų 37 °C flakono turinio temperatūra.
3. Į kiekvieno flakono 10,0 ml pusiausvriosios būsenos „CHANG Medium BMC“ terpę pasėkite po 0,5 ml (500 µl) mėginio arba kitą atitinkamą kiekį, priklausomai nuo leukocitų (WBC) skaičiaus. Jei leukocitų skaičius yra didelis (>30 000), įterpkite mažiau mėginio, o jei leukocitų skaičius yra mažas (<5000) – daugiau mėginio.
4. Inkubuokite flakoną 37 °C temperatūroje 1–2 dienas.

Kultūrų surinkimas

1. Išimkite kultūras iš inkubatoriaus ir atsargiai sukiodami resuspenduokite ląsteles.
2. Flakono turinį perpilkite į 15 ml talpos centrifuginį mėgintuvėlį.
3. Į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinkite po 100 µl pradinio „Colcemid“ tirpalo (10 µg/ml).
4. Mėgintuvėlius uždenkite ir vartydami sumaišykite turinį.
5. Mėgintuvėlius inkubuokite 20 minučių 37 °C temperatūroje.
6. Po inkubacijos mėgintuvėlius 8 minutes centrifuguokite esant 1200 apsisukimų per minutę (300 x g).
7. Atsargiai iš kiekvieno mėgintuvėlio nusiurbkite supernatantą.
8. Atsargiai maišydami arba rodomuoju pirštu patapšnodami mėgintuvėlio dugną, resuspenduokite ląstelių nuosėdas.
9. Purtydami sūkurinėje maišyklėje (lėčiausiu režimu), į kiekvieną mėgintuvėlį LABAI LĒTAI įpilkite po 10 ml hipotoninio tirpalo (0,075 M kalio chlorido).
10. Palikite mėgintuvėlius 20 minučių pastovėti kambario temperatūroje (hipotoninis apdorėjimas).
11. Mėgintuvėlius 8 minutes centrifuguokite esant 1200 apsučių per minutę (300 x g).
12. Nusiurbkite supernatantą virš nusėdusių ląstelių palikdami apie 1,0 ml hipotoninio tirpalo. PASTABA. 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.
13. Ląstelių nuosėdas resuspenduokite, kaip aprašyta 8 etape.
14. Purtydami sūkurinėje maišyklėje (lėčiausiu režimu), į kiekvieną mėgintuvėlį LABAI LĒTAI įpilkite po 10 ml santykiu 3:1 paruošto metanolio ir acto rūgšties fiksatyvo mišinio.

15. Palikite mėgintuvėlius 20 minučių pastovėti kambario temperatūroje (pirmasis fiksavimas).
16. Pakartokite 11–13 etapus.
17. Įpilkite 5 ml fiksatyvo, kaip nurodyta 14 etape.
18. Palikite mėgintuvėlius 10 minučių pastovėti kambario temperatūroje (antrasis fiksavimas).
19. Pakartokite 16–18 etapus (trečiasis fiksavimas).
20. Šitaip užfiksuotą ląstelių kultūrą galima naudoti tuoj pat tepinėlių preparatams ruošti laboratorijoje nustatyta standartinė tvarka arba galima laikyti šaldytuve (2 °C–8 °C) vėlesniems tyrimams.

LAIKYMAS IR STABILUMAS

Iki naudojimo „CHANG Medium BMC“ terpė reikia laikyti užšaldytą žemesnėje kaip –10 °C temperatūroje. Laikant užšaldytą, „CHANG Medium BMC“ terpė išlieka stabili iki tinkamumo datos, pažymėtos butelio etiketėje. Atitirpinus, nesunaudotą produkto likutį galima išpilstyti darbinėmis dalimis ir vėl užšaldyti vėlesniam naudojimui arba sandariai uždengus laikyti 2 °C–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 BMC“ terpės sudėtyje yra FBS ir GCT kondicionuotos terpių, todėl su ja dirbant reikia imtis įprastinių laboratorinės praktikos atsargumo priemonių. Terpės sudėtyje yra antibiotiko (gentamicino), 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 BMC çeşitli hematolojik bozuklukların karyotiplenmesi ve diğer genetik testler için yapılan klinik İnsan Kemik İliği Kültürlerinde primer kültür için kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

CIHAZ TANIMI

CHANG Medium BMC, FSS, HEPES tamponu, L-glutamin, Dev Hücreli Tümör (GCT) Koşullandırılmış Vasat ve Gentamisin Sülfatlı RPMI Medium 1640'tan oluşan, kullanıma hazır bir vasattır. CHANG Medium BMC sitogenetik analiz için etkili hücre yapışması ve kemik iliği hücrelerinin üremesini desteklemek üzere optimize edilmiştir. Kemik iliği kültürünün yapılmasından önce herhangi bir bileşen eklenmesi gerekmez.

BİLEŞENLER

<u>Amino Asit</u>	<u>Proteinler,</u>	<u>Vitaminler ve eser</u>
Arjinin	<u>Hormonlar ve</u>	<u>elemanlar</u>
Asparajin	<u>Büyüme Faktörleri</u>	Folik asit
Aspartik Asit	Fetal siğir serumu	Nikotinamid
Sistin	(FSS)	Riboflavin
Glutamin		Tiyamin
Glutamik Asit	<u>pH Göstergesi</u>	Pantotenik asit
Glisin	Fenol kırmızısı	Kobalamin
Histidin		Piridoksin
Hidroksiprolin	<u>Tuzlar ve İyonlar</u>	Aminobenzoik asit
İzolösin	Sodyum klorür	
Lösin	Kolin klorür	<u>Diğer</u>
Lizin	Potasyum klorür	Dev hücreli tümör
Metiyonin	Magnezyum sülfat	koşullandırılmış
Fenilalanin	Sodyum fosfat	vasat (GCT-CM)
Prolin	Kalsiyum Nitrat	Glutasyon
Serin		Biyotin
Treonin	<u>Tamponlar</u>	
Triptofan	Sodyum bikarbonat	<u>Enerji Substratları</u>
Tirozin	HEPES	Glukoz
Valin		İnositol
<u>Su</u>	<u>Antibiyotik</u>	
Enjeksiyonluk	Gentamisin Sülfat	
Su Kalitesi		

GEREKLİ AMA SAĞLANMAYAN MATERYAL VE EKİPMAN

1. Plastik Steril Santrifüj Tüpleri ve Kültür Flaskları
2. 37°C'de CO₂ İnkübatörü
3. Tezgah Santrifüjü
4. Vorteks Karıştırıcı
5. Colcemid Stok Solüsyonu, 10 µg/mL
6. Potasyum Klorür Solüsyonu, 0,075 M
7. Fiksatif Solüsyon, Metanol:Asetik Asit (3:1)

KALİTE GÜVENÇE

Numuneler, kültür koşulları ve reaktiflerin seçimi dahil birkaç faktör elde edilen sonucu etkileyebilir. Kullanıcıların rutin kullanıma sokmadan önce her yeni reaktif partisini bilinen uygun aktiviteye sahip referans materyalle birlikte çalışmalarını önerilir. Her CHANG Medium BMC lotu bağımsız bir Klinik Sitogenetik Laboratuvarında bir kontrol vasatıyla karşılaştırılarak Klinik Kemik İliği Kültürlerinde performans testinden geçmiştir. Sonuçlar lota özel bir Analiz Sertifikasında bildirilir.

KULLANIM HAZIRLIĞI

CHANG Medium BMC buzdolabında (2°C - 8°C) gece boyunca çözöldükten sonra homojenliği sağlamak için hafifçe karıştırılmalıdır. Steril kültür flasklarına aseptik olarak 10 mL vasat koyun ve kemik iliği kültürlerinde hemen kullanım için 37°C'ye deşgeleyin.

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

KULLANMA TALİMATI

Örnek Hazırlama:

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

- 5 mL üzerinde kemik iliği aspiratı alınırsa örnekte hemodilüsyon olabilir. Kemik iliği fraksiyonunu izole etmek için numuneyi santrifüjleyin.
- Numune transfer vasatında gelirse örneği santrifüjleyip transfer vasatını (süpernatant) alın. Kalan aspirat fraksiyonunu kullanarak inokülasyon yapın.

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.

Kemik İliği Kültürü:

Tüm kültür kaplarını hasta adı, numune numarası ve kültür tipiyle etiketleyin. Her numune için şunları içeren bir flask hazırlayın:

1. 10,0 mL CHANG Medium BMC.
2. Numune inokülasyonundan önce flaskı 37°C'ye deşgeleyin.
3. 10,0 mL önceden dengelenmiş CHANG Medium BMC içeren her flaskta 0,5 mL (500 µL) veya akyuvar sayımına göre uygun miktarda numune inokülasyonu yapın. Akyuvarlar yüksekse (> 30.000) daha az numune veya akyuvarlar düşükse (< 5.000) daha fazla numune ekleyin.
4. Flaskı 37°C'de 1 - 2 gün inkübe edin.

Kültürlerden Toplama:

1. Kültürleri inkübatörden çıkarın ve hücreleri tekrar süspansiyon haline getirmek için yavaşça çevirin.
2. Flaskın içeriğini bir 15 mL santrifüj tüpüne aktarın.
3. Her tüpe 100 µL stok Colcemid (10 µg/mL) ekleyin.
4. Tüplerin kapağını kapatın ve ters düz ederek karıştırın.
5. Tüpleri 37°C'de 20 dakika inkübe edin.
6. İnkübasyondan sonra tüpleri 8 dakika boyunca 1200 devir/dk (300 x g) hızında santrifüjleyin.
7. Her tüpten süpernatantı dikkatle aspire edin.
8. Hücre pelletini hafifçe karıştırarak veya tüpün alt kısmına işaret parmağıyla fiske vurarak tekrar süspansiyon haline getirin.
9. ÇOK YAVAŞÇA vorteksleme sırasında (en düşük ayarda) her tüpe 10 mL hipotonik solüsyon (0,075 M Potasyum Klorür) ekleyin.
10. Tüpleri oda sıcaklığında 20 dakika bırakın (hipotonik muamele).
11. Tüpleri 8 dakika boyunca 1200 devir/dk (300 x g) hızında santrifüjleyin.
12. Süpernatantı aspire edip hücre pelleti üzerinde yaklaşık 1,0 mL hipotonik solüsyon bırakın. NOT: Santrifüjlemeden sonra hücre pelletinden yukarıya süpernatant içine uzanabilecek fibröz materyal açısından dikkatli olun. En son birkaç mL süpernatantın tüm hücre pelletinin atık kabına aspirasyonundan kaçınmak üzere bir Pasteur pipetiyle (vakum aspirasyonu kullanmadan) alınması gerekebilir.
13. Hücre pelletini 8. adımda tanımlandığı gibi tekrar süspansiyon haline getirin.
14. ÇOK YAVAŞÇA vorteksleme sırasında (en düşük ayarda) her tüpe 10 mL 3:1 Metanol:Asetik asit fiksatif ekleyin.
15. Tüpleri oda sıcaklığında 20 dakika bırakın (birinci sabitleme).
16. 11 - 13. adımları tekrarlayın.
17. Adım 14'teki gibi 5 mL fiksatif ekleyin.
18. Tüpleri oda sıcaklığında 10 dakika bırakın (ikinci sabitleme).

19. 16 - 18. adımları tekrarlayın (üçüncü sabitleme).
20. Bu noktada sabit hücre pelletleri laboratuvarın standart protokolüne göre lam hazırlama için hemen kullanılabilir veya gelecekte kullanım için buzdolabında (2°C - 8°C) saklanabilir.

SAKLAMA VE STABİLİTE

CHANG Medium BMC kullanıma hazır olana kadar -10°C'nin altında dondurulmuş şekilde saklanmalıdır. CHANG Medium BMC dondurulmuş olarak muhafaza edildiğinde şişe etiketinde gösterilen son kullanım tarihine kadar stabildir. Çözöldükten sonra kullanılmamış herhangi bir ürün çalışma alikotlarına aktarılıp daha sonra kullanılmak üzere tekrar dondurulabilir veya kapağı sıkıca kapatılıp 2°C - 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 BMC, FSS ve dev hücreli tümör koşullandırılmış vasat içerir ve evrensel laboratuvar önlemlerine göre kullanılmalıdır. Vasat, bakteriyel kontaminasyon potansiyelini azaltmak için bir antibiyotik (gentamisin) içerir ama vasatı verirken daima aseptik teknikler kullanılmalıdır. Kırmızı renkte olmayan herhangi bir vasatı kullanmayın.

SLOVENČINA

INDIKÁCIA NA POUŽITIE

CHANG Medium BMC je určené na použitie pri primárnej kultivácii klinických kultúr ľudskej kostnej drene na karyotypovanie a iné genetické testy na hematologické poruchy.

POPIS ZARIADENIA

CHANG Medium BMC je médium určené na priame použitie obsahujúce RPMI Medium 1640, s FBS, pufrom HEPES, L-glutamínom, médiom upraveným veľkobunkovým karcinómom (GCT) a gentamicínsulfátom. CHANG Medium BMC je optimalizované na podporu účinného uchytania buniek a rast buniek kostnej drene na cytogenetickú analýzu. Pred kultiváciou kostnej drene sa nevyžaduje prídanie žiadnych komponentov.

ZLOŽKY

<u>Aminokyseliny</u>	<u>Bielkoviny, hormóny a rastové faktory</u>	<u>Vitamíny a stopové prvky</u>
arginín	fetálne bovinné sérum (FBS)	kyselina listová
asparagín		nikotínamid
kyselina asparágová		riboflavín
cystín	<u>Indikátor pH</u>	tiamín
glutamín	fenolová červeň	kyselina pantoténová
kyselina glutámová		kobalamín
glycín	<u>Soli a ióny</u>	pyridoxín
histidín	chlorid sodný	kyselina aminobenzoová
hydroxyprolín	cholín vápenatý	
izoleucín	chlorid draselný	
leucín	síran horečnatý	
lyzín	fosfát sodný	<u>Iné</u>
metionín	dusičnan vápenatý	médium upravené veľkobunkovým karcinómom (GCT-CM)
fenylalanín		glutatión
prolín	<u>Pufre</u>	biotín
serín	hydrogénuhlíčitán sodný	
treonín	HEPES	
tryptofán		
tyrozín	<u>Antibiotikum</u>	<u>Energetické substráty</u>
valín	gentamicínsulfát	glukóza
		inositol

Voda
kvalita vody
na injekciu

VYŽADOVANÉ, NO NEDODÁVANÉ MATERIÁLY A VYBAVENIE

1. Plastové sterilné skúmavky na odstreďovanie a fľaštičky na kultúru
2. Inkubátor CO₂ pri teplote 37 °C
3. Laboratórna odstredivka
4. Vírivý mixér
5. Kmeňový roztok Colcemid, 10 µg/ml
6. Roztok chloridu draselného, 0,075 M
7. Fixačný roztok, metanol : kyselina octová (3:1)

KONTROLA KVALITY

Viacere faktory, vrátane zdroja vzoriek, podmienok kultivácie a výberu reagentií, môžu ovplyvniť získaný výsledok. Používateľom sa odporúča, aby každú novú šaržu reagentie spustili paralelne s referenčným materiálom známej vhodnej aktivity predtým, než ju začnú bežne používať. Každá šarža CHANG Medium BMC mala vyskúšaný výkon na klinických kultúrach ľudskej drene v nezávislom laboratóriu pre klinickú cytogenetiku porovnaním s kontrolným médiom. Výsledky sa zaznamenávajú na certifikát analýzy pre špecifickú šaržu.

PRÍPRAVA NA POUŽITIE

CHANG Medium BMC sa má rozmraziť v chladničke cez noc (2 °C – 8 °C) a potom jemne premiešať, aby sa zaisťila homogénnosť. Asepticky nadávkujte 10 ml média do sterilných fľaštičiek na kultúru a ustáľte na teplotu 37 °C na okamžitú aplikáciu pre kultúru kostnej drene.

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

NÁVOD NA POUŽITIE

Príprava vzorky:

Použite 0,5 až 1,0 ml aspirátu kostnej drene ošetreného heparínom sodným. Lítium heparín, EDTA alebo citrátové antikoagulantia sú nevhodné na cytogenetické štúdie.

- Ak dostanete viac než 5 ml aspirátu kostnej drene, vzorka môže byť zriedená. Vzorku odstreďte, aby sa izolovala frakcia kostnej drene.
- Ak vzorka príde v prenosnom médiu, odstreďte ju a odstráňte prenosné médium (supernatant). Naočkujte pomocou zostávajúcej frakcie aspirátu.

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.

Kultivácia kostnej drene:

Všetky nádoby s kultúrami označte menom pacienta, číslom vzorky a typom kultúry. Pre každú vzorku pripravte fľaštičku obsahujúcu:

1. 10,0 ml CHANG Medium BMC.
2. Fľaštičku ustáľte na teplotu 37 °C pred naočkováním vzorky.
3. Naočkujte 0,5 ml (500 µl) vzorky, alebo primerané množstvo podľa počtu bielych krviniek (WBC), do každej fľaštičky obsahujúcej 10,0 ml vopred ustáleného CHANG Medium BMC. Ak je WBC vysoký (> 30 000), pridajte menej vzorky, alebo ak je WBC nízky (< 5 000), pridajte viac vzorky.
4. Fľaštičku inkubujte pri teplote 37 °C 1 – 2 dni.

Zber kultúr:

1. Kultúry vyberte z inkubátora a jemne zavíрте, aby sa bunky resuspendovali.
2. Obsah fľaštičky preneste do 15 ml skúmavky na odstreďovanie.
3. Do každej skúmavky pridajte 100 µl kmeňového Colcemidu (10 µg/ml).
4. Na skúmavky nasadte vrchnáky a premieľajte prevrátením.
5. Skúmavky inkubujte pri teplote 37 °C 20 minút.
6. Po inkubácii skúmavky odstreďte 8 minút pri 1 200 otáčok za minútu (300 x g).
7. Z každej skúmavky pozorne aspirujte supernatant.
8. Bunkovú peletu resuspendujte jemným zmiešaním alebo poklepaním dna skúmavky ukazovákom.
9. VELMI POMALY pridajte do každej skúmavky 10 ml hypotonického roztoku (0,075 M chloridu draselného) za vírenia (na najnižších obrátkach).
10. Skúmavky nechajte odstáť pri izbovej teplote 20 minút (hypotonické ošetrenie).
11. Skúmavky odstreďte 8 minút pri 1 200 otáčok za minútu (300 x g).
12. Aspirujte supernatant, pričom ponechajte asi 1,0 ml hypotonického roztoku nad bunkovou peletou. POZNÁMKA: Dávajte pozor na vláknitý materiál, ktorý môže trčať z bunkovej pelety do supernatantu po odstreďení. Posledných pár ml supernatantu môže byť potrebné odstrániť ručne Pasteurovou pipetou (bez použitia vákuového odsávania), aby sa do odpadovej nádoby neaspirovala celá bunková peleta.
13. Bunkovú peletu resuspendujte tak, ako je popísané v kroku 8.
14. VELMI POMALY pridajte do každej skúmavky 10 ml 3:1 metanol : fixačná kyselina octová za vírenia (na najnižších obrátkach).
15. Skúmavky nechajte odstáť pri izbovej teplote 20 minút (prvá fixácia).
16. Zopakujte kroky 11 – 13.
17. Pridajte 5 ml fixačného roztoku tak ako v kroku 14.
18. Skúmavky nechajte odstáť pri izbovej teplote 10 minút (druhá fixácia).

19. Zopakujte kroky 16 – 18 (tretia fixácia).

20. V tomto bode možno zafixované bunkové pelety okamžite použiť na prípravu sklíčok podľa štandardného protokolu laboratória alebo uchovať v chladničke (2 °C – 8 °C) na budúce použitie.

UCHOVÁVANIE A STABILITA

CHANG Medium BMC sa má uchovávať pri teplote pod -10 °C, až kým nebude pripravené na použitie. CHANG Medium BMC bude stabilné až do dátumu expirácie vytlačeného na označení fľaše, ak sa uchováva zmrazené. Po rozmrazení všetok nepoužitý produkt možno nadávkoovať do pracovných alikvót a znovu zmraziť v 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 vyššieho vzdelania, ktoré zahŕňajú aplikáciu, na ktorú je toto zariadenie určené.

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

ПОКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

CHANG Medium BMC е предназначена за използване в първично култивиране на клинични култури на човешки костен мозък за кариотипизиране и други генетични тествания на различни хематологични нарушения.

ОПИСАНИЕ НА ИЗДЕЛИЕТО

CHANG Medium BMC е готова за употреба среда, която се състои от RPMI Medium 1640 с FBS (фетален говежди серум), буфер HEPES, L-глутамин, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium (кондиционирана среда от гигантскоклетъчен тумор (GCT)) и гентамицин сулфат. CHANG Medium BMC е оптимизирана да поддържа ефективно прикрепяне на клетки и растеж на клетки на костен мозък за цитогенетичен анализ. Не е необходимо добавяне на компоненти преди култивиране на костен мозък.

КОМПОНЕНТИ

<u>Аминокиселина</u>	<u>Протеини</u>	<u>Витамини</u>
Аргинин	<u>хормони</u>	<u>и микроелементи</u>
Аспарагин	<u>и растежни</u>	Фолиева
Аспарагинова	<u>фактори</u>	киселина
киселина	Фетален говежди	Никотинамид
Цистин	серум (FBS)	Рибофлавин
Глутамин		Тиамин
Глутаминова	<u>pH индикатор</u>	Пантотенова
киселина	Фенол, червен	киселина
Глицин		Кобаламин
Хистидин	<u>Соли и йони</u>	Пиридоксин
Хидроксипролин	Натриев хлорид	Аминобензоена
Изолевцин	Холин хлорид	киселина
Левцин	Калиев хлорид	<u>Други</u>
Лизин	Магнезиев сулфат	Кондиционирана
Метионин	Натриев фосфат	среда от
Фенилаланин	Калциев нитрат	гигантскоклетъчен
Пролин		тумор (GCT-CM)
Серин	<u>Буфери</u>	Глутатион
Треонин	Натриев	Биотин
Триптофан	бикарбонат	
Тирозин	HEPES	<u>Енергийни</u>
Валин		<u>субстрати</u>
	<u>Антибиотик</u>	Глюкоза
<u>Вода</u>	Гентамицин	Инозитол
Качество – вода	сулфат	
за инжектиране		

НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ И ОБОРУДВАНЕ, КОИТО НЕ СА ДОСТАВЕНИ

1. Пластмасови, стерилни, центрофужни епруветки и слайд-флаconi за култури
2. CO₂ инкубатор за 37° C
3. Настолна центрофуга
4. Вихров миксер
5. Изходен разтвор на колцемид, 10 µg/ml
6. Разтвор на калиев хлорид, 0,075 M
7. Фиксиращ разтвор, метанол:оцетна киселина (3:1)

КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

Няколко фактора, включително източника на спесимени, 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 BMC е тествана за ефективност върху клинични култури на костен мозък в независима клинична лаборатория по цитогенетика спрямо контролна среда. Резултатите са посочени в конкретния за партидата Сертификат за анализ.

ПОДГОТОВКА ЗА УПОТРЕБА

CHANG Medium BMC трябва да се размрази за една нощ в хладилник (2 – 8° C) и след това внимателно да се размеси, за да се осигури хомогенност. Асептично накапете 10 ml от средата в стерилни слайд-флаconi за култури и еквилибрирайте до 37° C за незабавна употреба за култури на костен мозък.

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

УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

Подготовка на проба:

Използвайте 0,5 до 1,0 ml натриево хепаринизиран аспират на костен мозък. Литиев хепарин, EDTA или цитратни антикоагуланти са неподходящи за цитогенетични изследвания.

- Ако е получен аспират на костен мозък повече от 5 ml, пробата може да е хемодилут (примесена с кръв). Центрофугирайте спесимена, за да изолирате фракцията костен мозък.
- Ако спесименът пристигне в трансферна среда, центрофугирайте пробата и отстранете транспортната среда (супернатант). Инокулирайте с останалата фракция аспират.

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.

Култура на костен мозък:

Обозначете с етикет всички съдове с култури с името на пациента, номера на спесимена и типа на културата. За всеки спесимен пригответе слайд-флакон, съдържащ:

1. 10,0 ml CHANG Medium BMC.
2. Еквилибрирайте слайд-флакона до 37° C преди инокулацията на спесимена.
3. Инокулирайте 0,5 ml (500 µl) спесимен или подходящото количество в зависимост от броя бели кръвни клетки (WBC), във всеки слайд-флакон, съдържащ 10,0 ml предварително еквилибрирана CHANG Medium BMC. Добавете по-малко спесимен, ако броят WBC е висок (> 30 000), или повече спесимен, ако броят WBC е нисък (< 5000).
4. Инкубирайте слайд-флакона при 37° C за 1 – 2 дни.

Събиране на културите:

1. Отстранете културите от инкубатора и внимателно разклатете с кръгови движения, за да ресуспендирайте клетките.
2. Прехвърлете съдържанието на слайд-флакона в центрофужна епруветка от 15 ml.
3. Добавете 100 µl изходен разтвор на колцемид (10 µg/ml) към всяка епруветка.
4. Затворете епруветките с капачка и смесете с преобръщане.
5. Инкубирайте епруветките при 37° C за 20 минути.
6. След инкубация центрофугирайте епруветките за 8 минути при 1200 грт (300 x g).
7. Внимателно аспирирайте супернатанта от всяка епруветка.
8. Ресуспендирайте пелетата от клетки, като размесите внимателно или като потупате дъното на епруветката с показалеца на ръката.
9. МНОГО БАВНО добавете 10 ml хипотоничен разтвор (0,075 M калиев хлорид) към всяка епруветка, докато размесвате с вихров миксер (при най-ниската настройка).
10. Оставете епруветките на стайна температура за 20 минути (хипотонично третиране).
11. Центрофугирайте епруветките за 8 минути при 1200 грт (300 x g).
12. Аспирирайте супернатанта, като оставите около 1,0 ml хипотоничен разтвор над пелетата от клетки.

ЗАБЕЛЕЖКА: 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.

13. Ресуспендирайте пелетата от клетки, както е описано в стъпка 8.
14. МНОГО БАВНО добавете 10 ml фиксиращ разтвор 3:1 метанол:оцетна киселина към всяка епруветка, докато размесвате с вихров миксер (при най-ниската настройка).
15. Оставете епруветките на стайна температура за 20 минути (първо фиксиране).
16. Повторете стъпки 11 – 13.
17. Добавете 5 ml фиксиращ разтвор, както в стъпка 14.
18. Оставете епруветките на стайна температура за 10 минути (второ фиксиране).
19. Повторете стъпки 16 – 18 (трето фиксиране).
20. 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 – 8° C) за бъдеща употреба.

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ

CHANG Medium BMC трябва да се съхранява замразена при температура под -10° C до момента на използването ѝ. CHANG Medium BMC 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 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 BMC съдържа FBS (фетален говежди серум) и кондиционирана среда от GCT (гигантскоклетъчен тумор) и с нея трябва да се борави съгласно универсалните лабораторни предпазни мерки. Средата съдържа антибиотик (гентамицин) 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.

INDIKACIJE ZA UPOTREBU

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

OPIS PROIZVODA

Medij CHANG Medium BMC spreman je za upotrebu, a sastoji se od medija RPMI Medium 1640 s FBS-om, pufera HEPES, L-glutamina, kondicioniranog medija gigantocelularnog tumora (GCT) i gentamicinsulfata. Medij CHANG Medium BMC optimiran je kako bi podržao učinkovito pričvršćivanje stanica i rast stanica koštane srži za citogenetičku analizu. Nije potrebno dodavati nikakve komponente prije uzgoja kulture koštane srži.

KOMPONENTE

<u>Aminokiselina</u>	<u>Proteini, hormoni i čimbenici rasta</u>	<u>Vitamini i elementi u tragovima</u>
Arginin	Fetalni goveđi serum (FBS)	Folna kiselina
Asparagin		Nikotinamid
Aspartatna kiselina		Riboflavin
Cistin	<u>pH indikator</u>	Tijamin
Glutamin	Fenol crveno	Pantotenska kiselina
Glutamatna kiselina		Kobalamin
Glicin	<u>Soli i ioni</u>	Piridoksin
Histidin	Natrijev klorid	Aminobenzoatna kiselina
Hidroksiprolin	Kolinijev klorid	<u>Ostalo</u>
Izoleucin	Kalijev klorid	Kondicionirani medij gigantocelularnog tumora (GCT-CM)
Leucin	Magnezijev sulfat	Glutation
Lizin	Natrijev fosfat	Biotin
Metionin	Kalcijev nitrat	<u>Energetski supstrati</u>
Fenilalanin		Glukoza
Prolin	<u>Puferi</u>	Inozitol
Serin	Natrijev hidrogenkarbonat	
Treonin	HEPES	
Triptofan	<u>Antibiotik</u>	
Tirozin	Gentamicinsulfat	
Valin		

Voda

Kvaliteta u skladu s propisanoj za vodu za injekcije

POTREBNI MATERIJALI I OPREMA KOJI NISU PRILOŽENI

1. Plastične sterilne epruvete za centrifugu i tikvice za kulturu
2. CO₂ inkubator na 37 °C
3. Stolna centrifuga
4. Vrtložna miješalica
5. Temeljna standardna otopina kolcemida 10 µg/ml
6. Otopina kalijevog klorida 0,075 mol/l
7. Otopina za fiksaciju, metanol:octena kiselina (3:1)

OSIGURANJE KVALITETE

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

PRIPREMA ZA UPOTREBU

Medij CHANG Medium BMC mora se odmrzavati u hladnjaku (2 – 8 °C) preko noći i zatim lagano promiješati kako bi se osigurala homogenost. Aseptički prenijeti 10 ml medija u sterilne tikvice za kulturu i uravnotežiti na 37 °C kako bi se mogao odmah upotrijebiti za kulture koštane srži.

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

UPUTE ZA UPOTREBU

Priprema uzorka:

upotrijebiti 0,5 do 1,0 ml aspirata koštane srži u heparin natriju. Litijev heparin, EDTA i citratni antikoagulansi nisu podobni za citogenetička ispitivanja.

- Dobije li se više od 5 ml aspirata koštane srži, moguće je da je uzorak hemodiluiran. Centrifugirati uzorak kako bi se izolirala frakcija koštane srži.
- Zaprimi li se uzorak u mediju za prijenos, centrifugirati uzorak i ukloniti medij za prijenos (supernatant). Inokulirati preostalom frakcijom aspirata.

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.

Kultura koštane srži:

Na svim posudama s kulturama navesti ime pacijenta, broj uzorka i vrstu kulture. Za svaki uzorak pripremiti tikvicu koja sadrži:

1. 10,0 ml medija CHANG Medium BMC.
2. Prije inokulacije uzorka uravnotežiti tikvicu na 37 °C.
3. Inokulirati 0,5 ml (500 µl) uzorka (ili odgovarajuću količinu ovisno o broju leukocita) u svaku tikvicu koja sadrži 10,0 ml prethodno uravnoteženog medija CHANG Medium BMC. Dodati manju količinu uzorka ako je broj leukocita visok (> 30.000) ili veću količinu uzorka ako je broj leukocita nizak (< 5.000).
4. Inkubirati tikvicu na 37 °C 1 – 2 dana.

Prikupljanje kultura:

1. Izvaditi kulture iz inkubatora i lagano promućkati kako bi se obnovila suspenzija stanica.
2. Prenijeti sadržaj tikvice u epruvetu od 15 ml za centrifugu.
3. U svaku epruvetu dodati 100 µl temeljne standardne otopine kolcemida (10 µg/ml).
4. Začepiti epruvete i miješati prevrtanjem.
5. Inkubirati epruvete 20 minuta na 37 °C.
6. Nakon inkubacije centrifugirati epruvete 8 minuta na 1200 o/min (300 x g).
7. Pažljivo aspirirati supernatant iz svake epruvete.
8. Obnoviti suspenziju taloga stanica lagano miješajući ili lupkajući dno epruvete kažiprstom.
9. VRLO POLAKO dodavati 10 ml hipotonične otopine (0,075 mol/l kalijevog klorida) u svaku epruvetu dok su epruvete u vrtložnoj miješalici (koja je postavljena na najnižu postavku).
10. Ostaviti epruvete da miruju na sobnoj temperaturi 20 minuta (hipotonična obrada).
11. Centrifugirati epruvete 8 minuta na 1200 o/min (300 x g).
12. Aspirirati supernatant i ostaviti otprilike 1,0 ml hipotonične otopine iznad taloga stanica.
NAPOMENA: 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 vakuuskom aspiracijom) da ne bi došlo do aspiracije čitavog taloga stanica u spremnik za otpad.
13. Obnoviti suspenziju taloga stanica kako je opisano u 8. koraku.
14. VRLO POLAKO dodavati 10 ml otopine za fiksaciju (metanol:octena kiselina [3:1]) u svaku epruvetu dok su epruvete u vrtložnoj miješalici (koja je postavljena na najnižu postavku).
15. Ostaviti epruvete da miruju na sobnoj temperaturi 20 minuta (prva fiksacija).
16. Ponoviti korake 11. – 13.
17. Dodati 5 ml fiksativa kako je opisano u 14. koraku.
18. Ostaviti epruvete da miruju na sobnoj temperaturi 10 minuta (druga fiksacija).

19. Ponoviti korake 16. – 18. (treća fiksacija).

20. 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) za upotrebu u budućnosti.

POHRANA I STABILNOST

Medij CHANG Medium BMC mora se čuvati zamrznut na temperaturi manjoj od -10 °C dok ga se ne bude trebalo upotrijebiti. Medij CHANG Medium BMC stabilan je do isteka roka valjanosti koji je naveden na oznaci boce kada ga se čuva u zamrznutom stanju. Nakon odmrzavanja sav neiskorišten proizvod može se raspodijeliti u alikvote odgovarajuće veličine za rad i ponovno zamrznuti za kasniju upotrebu ili ga se može čvrsto začepiti i čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C najviše 30 dana. 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 BMC sadrži FBS i kondicionirani medij GCT-a i njime se mora rukovati primjenjujući univerzalne laboratorijske mjere opreza. Medij sadrži antibiotik (gentamicin) 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.

INDIKAZZJONI GHALL-UŻU

CHANG Medium BMC huwa maħsub għall-użu fil-koltura primarja ta' Kolturi klinici ta' Mudullun Uman għall-karjotippar u testijiet ġenetiċi oħra ta' diversi mard ematoloġiku.

DESKRIZZJONI TAL-APPARAT

CHANG Medium BMC huwa midjum lest għall-użu li fih RPMI Medium 1640, b'FBS, bafer HEPES, L-glutamine, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium u Gentamicin Sulfate. CHANG Medium BMC ġie ottimizzat sabiex jappoġġa l-adeżjoni effiċjenti taċ-ċelloli u t-tkabbir taċ-ċelloli tal-mudullun għall-analiżi ċitoġenetika. Mhix meħtieġa z-zieda ta' ebda komponenti qabel it-tkabbir tal-mudullun.

KOMPONENTI

<u>Ċidri Amminici</u>	<u>Proteini, Ormoni u Fatturi ta' Tkabbir</u>	<u>Vitamini u mikroelementi</u>
Arginine	Fetal bovine serum (FBS)	Folic acid
Asparagine		Nicotinamide
Aspartic Acid		Riboflavin
Cystine	<u>Indikatur tal-pH</u>	Thiamine
Glutamine	Phenol Red	Pantothenic acid
Glutamic Acid		Cobalamin
Glycine		Pyridoxine
Histidine	<u>Imluha u Joni</u>	Aminobenzoic acid
Hydroxyproline	Sodium chloride	
Isoleucine	Choline chloride	<u>Oħrajn</u>
Leucine	Potassium chloride	Giant cell tumor conditioned medium (GCT-CM)
Lysine	Magnesium Sulfate	Glutathione
Methionine	Sodium phosphate	Biotin
Phenylalanine	Calcium Nitrate	
Proline		<u>Substrati tal-Energija</u>
Serine	<u>Baferi</u>	Glucose
Threonine	Sodium bicarbonate	Inositol
Tryptophan	HEPES	
Tyrosine		<u>Antibijotiku</u>
Valine	Gentamicin Sulfate	

Ilma

Kwalità tal-WFI (Ilma għall-injezzjonijiet)

MATERJALI U TAGHMIR MEHTIEĠ IŻDA MHUX IPROVDUT

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

ASSIGURAZZJONI TAL-KWALITÀ

Bosta fatturi inkluz is-sors tal-kampjuni, il-kundizzjonijiet ta' tkabbir u l-għażla tar-reagenti jistgħu jinfluwenzaw ir-riżultat miksub. L-utenti jingħataw il-parir li jhaddmu kull ammont ġdid tar-reagent b'mod parallel mal-materjal ta' referenza b'attività xierqa magħrufa qabel ma jibda jintuza b'mod regolari. Il-prestazzjoni ta' kull lott ta' CHANG Medium BMC ġiet ittestjata fuq Kolturi Klinici tal-Mudullun f'Laboratorju ta' Ċitoġenetika Klinika indipendenti fi tqabbil ma' medium ta' kontroll. Ir-riżultati jiġu rrapportati fuq Ċertifikat ta' Analizi speċifiku.

PREPARAZZJONI GHALL-UŻU

CHANG Medium BMC għandu jiġi mahlul matul il-lejl fi friġġ (2-8°C) imbagħad imħallat bil-mod sabiex tiġi żgurata l-omoġeneità. B'mod asettiku ddispensa 10 mL tal-midjum go flasks sterili ta' tkabbir u ekwilibra għal temperatura ta' 37°C għall-użu immedjat għal kolturi ta' mudullun.

Nota: Kristalli ta' calcium carbonate ta' spiss jiffurmaw f'CHANG Medium BMC. Il-preżenza ta' dawn il-kristalli ma jidherx li tikkawża effett detrimentali fuq il-prestazzjoni tal-prodott.

ISTRUZZJONIJIET DWAR L-UŻU

Preparazzjoni tal-Kampjun:

- Uża 0.5 sa 1.0 mL ta' aspirat tal-mudullun miżjud b'sodium heparin. Lithium heparin, EDTA, jew citrate anticoagulants mhumiex adattati għal studji ċitoġenetici.
- Jekk iktar minn 5 mL ta' aspirat tal-mudullun jiġi milqugħ, il-kampjun jista' jkun emodilwit (hemodilute). Dawwar il-kampjun 'l isfel biex tiżola l-parti tal-mudullun.
 - Jekk il-kampjun jasal f'midjum ta' trasport, dawwar il-kampjun 'l isfel u neħhi l-medium ta' trasport (is-supernatant). Aghmel l-inokulazzjoni billi tuża l-parti li fadal tal-aspirat.

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

It-Tkabbir tal-Mudullun:

Aghmel ticketta bl-isem tal-pazjent, in-numru tal-kampjun, u t-tip ta' koltura fuq il-kontenitur kollha. Għal kull kampjun ipprepara flask li jkun fih:

1. 10.0 mL CHANG Medium BMC.
2. Ekwilibra l-flask għal temperatura ta' 37°C qabel l-inokulazzjoni tal-kampjun.
3. Aghmel inokulazzjoni ta' 0.5 mL (500 µL) tal-kampjun, jew l-ammont xieraq skont l-għadd taċ-ċelloli bojad tad-dem (WBC), f'kull flask li fih ikun hemm 10.0 mL CHANG Medium BMC ekwilibrat minn qabel. Żid inqas mill-kampjun jekk il-WBC ikun għoli (> 30,000) jew iktar kampjun jekk il-WBC ikun baxx (< 5,000).
4. Inkuba l-flask f'temperatura ta' 37°C għal jum 1-jumejn (2).

Il-Ħsad tal-Kolturi:

1. Neħhi l-kolturi mill-inkubatur u dawwar bil-mod sabiex terġa' tissospendi ċ-ċelloli.
2. Ittrasferixxi l-kontenut tal-flask għal tubu ta' 15 mL taċ-ċentrifugu.
3. Żid 100 µL tas-soluzzjoni ewlenija ta' Colcemid (10 µg/mL) f'kull tubu.
4. Aghlaq it-tubi u hawwad billi taqlibhom 'l isfel.
5. Inkuba t'tubi f'temperatura ta' 37°C għal 20 minuta.
6. Wara l-inokulazzjoni, iċċentrifuga t-tubi għal 8 minuti fuq 1200 rpm (300 x g).
7. Bir-reqqa aspira s-supernatant minn kull tubu.
8. Erġa' ssospendi l-gerbuba taċ-ċelloli billi thawwad bil-mod, jew billi tagħti daqqa ħafifa lill-qiegħ tat-tubu bl-ewwel saba'.
9. BIL-MOD ĦAFNA żid 10 mL ta' soluzzjoni ipotonika (0.075 M Potassium Chloride) lil kull tubu filwaqt li ddawwar f'vortex (fuq l-inqas setting).
10. Ħalli t-tubi joqogħdu f'temperatura ambjentali għal 20 minuta (trattament ipotoniku).
11. Iċċentrifuga t-tubi għal 8 minuti fuq 1200 rpm (300 x g).
12. Aspira s-supernatant u halli madwar 1.0 mL tas-soluzzjoni ipotonika fuq il-gerbuba taċ-ċelloli. **NOTA:** 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 l-gerbuba taċ-ċelloli kollha tiġi aspirata fil-kontenitur tal-iskart.
13. Erġa' ssospendi l-gerbuba taċ-ċelloli kif deskritt fil-punt 8.
14. BIL-MOD ĦAFNA żid 10 mL tal-fissattiv 3:1 Methanol:Acetic acid f'kull tubu filwaqt li ddawwar f'vortex (fuq l-inqas setting).
15. Ħalli t-tubi joqogħdu f'temperatura ambjentali għal 20 minuta (l-ewwel fissazzjoni).
16. Irrepeti l-punti 11-13.
17. Żid 5 mL tal-fissattiv bħal fil-punt 14.

18. Ħalli t-tubi joqogħdu f'temperatura ambjentali għal 10 minuti (it-tieni fissazzjoni).

19. Irrepeti l-punti 16-18 (it-tielet fissazzjoni).

20. F'dan il-punt, il-gerbubi taċ-ċelloli fissati jistgħu jintużaw immedjatament għall-preparazzjoni tal-islaġds skont il-protokoll standard tal-laboratorju jew maħżun fi friġġ (2-8°C) għall-użu fil-futur.

HAŻNA U STABILITÀ

CHANG Medium BMC għandu jiġi maħżun iffrizat f'temperatura ta' inqas minn -10°C sakemm jiġi biex jintuża. CHANG Medium BMC huwa stabbli sad-data ta' skadenza li tidher fuq it-tikketta tal-fliskun meta maħżun skont l-istruzzjonijiet. Wara li jinħall, jekk jibqa' xi ammont ta' prodott li ma nutax jista' jiġi ddispensat f'alikwoti u ffrizat mill-ġdid għal użu fil-futur, jew jingħalaq sew u jinħażen f'temperatura ta' 2°C sa 8°C għal mhux iktar minn 30 jum. Ipproteġi minn dawl fluworexxenti.

PREKAWZJONIJIET U TWISSIJET

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

CHANG Medium BMC fih FBS u GCT conditioned medium u għandu jiġi mmaniġġjat bil-prekawzjonijiet universali tal-laboratorju. Dan il-midjum fih antibijotiku (gentamicin) sabiex jitnaqqas il-potenzjal għall-kontaminazzjoni mill-batterji, iżda dejjem għandhom jintużaw tekniki asettici meta jiġi ddispensat dan il-midjum. M'għandek tuża l-ebda medium li mhuwiex ta' kulur hamrani.

INDIKACIJE ZA UPORABO

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

OPIS PRIPOMOČKA

Medij CHANG Medium BMC, ki je že pripravljen za uporabo in vsebuje RPMI Medium 1640, FBS, pufer HEPES, L-glutamin, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium in gentamicinijev sulfat. Medij CHANG Medium BMC je optimiziran za podporo učinkovite pritrditve in rasti celic kostnega mozga za citogenetsko analizo. Pred gojenjem kostnega mozga ni treba dodati nobenih komponent.

KOMPONENTE

<u>Aminokisliline</u>	<u>Beljakovine,</u>	<u>Vitaminski elementi</u>
Arginin	<u>hormoni in rastni</u>	<u>v sledovih</u>
Asparagin	<u>faktorji</u>	Folna kislina
Asparaginska kislina	Serum govejega zarodka (FBS)	Nikotinamid
Cistin		Riboflavin
Glutamin	<u>Indikator</u>	Tiamin
Glutaminska kislina	<u> vrednosti pH</u>	Pantotenska kislina
Glicin	Fenol rdeče	Kobalamin
Histidin		Piridoksin
Hidroksiprolin	<u>Soli in ioni</u>	Aminobenzojska kislina
Izolevcin	Natrijev klorid	
Levcin	Holinklorid	<u>Drugo</u>
Lizin	Kalijev klorid	Kondicioniran
Metionin	Magnezijev sulfat	medij iz
Fenilalanin	Natrijev fosfat	velikoceličnih
Prolin	Kalcijev nitrat	tumorjev (GCT-CM)
Serin		Glutation
Treonin	<u>Pufri</u>	Biotin
Triptofan	Natrijev bikarbonat	
Tirozin	HEPES	<u>Energijski substrati</u>
Valin		Glukoza
	<u>Antibiotik</u>	Inozitol
<u>Voda</u>	Gentamicinijev sulfat	

Kakovost, ki ustreza vodi za injekcije

POTREBNI MATERIALI IN PRIPOMOČKI, KI NISO PRILOŽENI

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

ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI

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

PRIPRAVA ZA UPORABO

Medij CHANG Medium BMC je treba čez noč odtaliti v hladilniku (2–8 °C) in nato previdno premešati, da se zagotovi homogenost. Aseptično razdelite 10 ml medija v sterilne bučke za gojenje kultur in ga uravnotežite na 37 °C za takojšnjo uporabo s kulturami kostnega mozga.

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

NAVODILA ZA UPORABO

Priprava vzorcev:

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

- Če prejmete več kot 5 ml aspirata kostnega mozga, je vzrok lahko v hemodiluciji vzorca. V tem primeru vzorec centrifugirajte, da izolirate frakcijo kostnega mozga.
- Če vzorec prejmete v mediju za prenos, s centrifugiranjem odstranite medij za prenos (supernatant). Inokulirajte z uporabo preostale frakcije aspirata.

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.

Gojitev kostnega mozga:

Na vse posode za gojenje kultur zapišite ime bolnika, številko vzorca in tip kulture. Za vsak vzorec pripravite bučko, ki vsebuje:

1. 10,0 ml medija CHANG Medium BMC.
2. Pred inokulacijo vzorca bučko uravnotežite na 37 °C.
3. V vsako bučko, ki vsebuje 10,0 ml predhodno uravnoteženega medija CHANG Medium BMC, inokulirajte po 0,5 ml (500 µl) vzorca oziroma ustrezno količino glede na število belih krvnih celic (BKS). Če je število belih krvnih celic visoko (> 30.000), dodajte manj vzorca, in če je nizko (< 5000), dodajte več vzorca.
4. Bučko inkubirajte 1–2 dni pri temperaturi 37 °C.

Pobiranje kultur:

1. Kulture vzemite iz inkubatorja in jih nežno sukajte, da ponovno suspendirate celice.
2. Vsebino bučke prenesite v 15 ml centrifugirno epruveto.
3. V vsako epruveto dodajte 100 µl osnovne raztopine kolcemida (10 µg/ml).
4. Epruvete zaprite in premešajte vsebino z obračanjem.
5. Epruvete 20 minut inkubirajte pri temperaturi 37 °C.
6. Po inkubaciji epruvete 8 minut centrifugirajte pri 1200 vrt./min (300 x g).
7. Previdno aspirirajte supernatant iz vsake epruvete.
8. Celično usedlino ponovno suspendirajte tako, da jo narahlo premešate ali s kazalcem frcate po spodnjem delu epruvete.
9. ZELO POČASI dodajte 10 ml hipotonične raztopine (0,075 M kalijevega klorida) v vsako epruveto med mešanjem v vrtničnem mešalniku (pri najnižji nastavitvi).
10. Epruvete naj 20 minut počivajo pri sobni temperaturi (hipotonična obdelava).
11. Epruvete 8 minut centrifugirajte pri 1200 vrt./min (300 x g).
12. Aspirirajte supernatant, tako da nad celično usedlino ostane približno 1,0 ml hipotonične raztopine. OPOMBA: 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.
13. Ponovno suspendirajte celično usedlino, kot je opisano v 8. koraku.
14. ZELO POČASI dodajte 10 ml fiksacijske raztopine metanola in očetne kisline (razmerje 3 : 1) v vsako epruveto med mešanjem v vrtničnem mešalniku (pri najnižji nastavitvi).
15. Epruvete naj 20 minut počivajo pri sobni temperaturi (prvo fiksiranje).
16. Ponovite korake od 11 do 13.
17. Dodajte 5 ml fiksativa kot v 14. koraku.

18. Epruvete naj 10 minut počivajo pri sobni temperaturi (drugo fiksiranje).

19. Ponovite korake od 16 do 18 (tretje fiksiranje).

20. Na tej točki se lahko fiksirani celični peleti takoj uporabijo za pripravo preparatov skladno s standardnim protokolom laboratorija ali shranijo v hladilnik (2–8 °C) za nadaljnjo uporabo.

SHRANJEVANJE IN STABILNOST

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

PREVIDNOSTNI UKREPI IN OPOZORILA

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

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