

## CHANG Medium MF Mitogen-Free

Catalog No. 91005

100 mL, 500 mL

For *in vitro* diagnostic use.

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Solo per uso diagnostico *in vitro*.

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Pour diagnostics *in vitro*.

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Pro diagnostické použití *in vitro*.

Til *in vitro*-diagnostik.

*In vitro* -diagnostiikkaan.

Lietošanai *in vitro* diagnostikā.

Uitsluitend voor *in vitro* diagnostisch gebruik.

Do diagnostyki *in vitro*.

Pentru uz diagnostic *in vitro*.

För *in vitro*-diagnostik.

*In vitro* diagnostiliseks kasutamiseks.

*In vitro* diagnosztikai alkalmazáshoz.

Skirta *in vitro* diagnostikai.

*In vitro* diagnostik kullanım için.

Na diagnostické použitie *in vitro*.













За *in vitro* диагностична употреба.

Za upotrebu u *in vitro* dijagnostici.

Għal użu dijanjostiku *in vitro*.

Za diagnostično uporabo *in vitro*.

### Glossary of Symbols\*:

	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.

 **FUJIFILM Irvine Scientific, Inc.**

2511 Daimler Street, Santa Ana, California 92705 USA

Telephone: 1 949 261 7800 • 1 800 437 5706 • Fax: 1 949 261 6522 • [www.irvinesci.com](http://www.irvinesci.com)

## REFERENCES

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

**INDICATION FOR USE**

CHANG Medium MF is intended for use in culturing peripheral blood and other specimens for purposes of cytogenetic analysis.

**DEVICE DESCRIPTION**

CHANG Medium MF is a mitogen-free, ready to use medium consisting of RPMI containing 20% FBS, 2 mM glutamine, 20 mM HEPES buffer and the antibiotic Gentamicin Sulfate (35 µg/mL). CHANG Medium MF may require the addition of mitogenic agents, such as phytohemagglutinin (PHA) to optimize the growth of peripheral blood and other cells. The required concentration of PHA (or other mitogens) should be determined by the individual laboratory.

**COMPONENTS**

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

**QUALITY ASSURANCE**

**STERILITY**

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

Several factors including source of sample, culture conditions and selection of reagents can influence the result obtained. Users are advised to run each new batch of reagent in parallel with reference material of known suitable activity before adoption in routine use.

Each Lot of CHANG Medium MF is evaluated using peripheral blood for mitotic index, chromosomal length and quality compared to a control medium. Results are reported on a lot specific Certificate of Analysis.

**MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

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

## **SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING**

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

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

## **PREPARATION FOR USE**

CHANG Medium MF 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 MF. The presence of these crystals has not been shown to cause any detrimental effect on product performance.

## **DIRECTIONS FOR USE**

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

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

### **A. Preparation of Whole Blood Microcultures**

1. Collect 5-20 mL of fresh blood in phenol-free heparin and mix by inversion.
2. Reconstitute PHA by adding 5 mL sterile distilled water using a sterile syringe.
3. Using aseptic technique, prepare required volume of CHANG Medium MF (microculture medium) allowing 5 mL for each of two centrifuge tubes per blood sample.
4. Dispense CHANG Medium MF to appropriately labeled sterile screw-capped centrifuge tubes and aseptically add 0.1 mL reconstituted PHA.
5. Immediately before culture, add 0.4 mL of heparinized blood using a sterile 1 mL pipette. Use 0.3 mL of blood for infants and children and 0.5 mL for pregnant women.
6. Incubate the cultures at 37°C for 72 hours. For infant and children samples, incubate one of the two cultures at 37°C for 48 hours. For pregnant women, one of the two cultures can be incubated at 37°C for 96 hours. Mix each tube by inversion daily.
7. Add 0.05 mL (50 µL)/5 mL of working solution of methotrexate to each culture 16-18 hours before addition of thymidine.
8. Add 0.1 mL (100 µL)/5 mL of working solution of thymidine to each culture after completion of methotrexate synchronization (5-6 hours before harvest).

### **B. Harvesting the Cultures**

1. Pre-warm the hypotonic solution (75 mM potassium chloride) in a 37°C water bath prior to harvest.
2. Add 0.5 µL of a solution of Colcemid to each culture.
3. Mix gently and return to the 37°C incubator.
4. Remove the cultures from the incubator after 30 minutes.
5. Centrifuge the cultures in a bench centrifuge at 1,000 rpm for 10 minutes.
6. Remove most of the supernatant fluid and discard.
7. Resuspend the pellet in 6 to 8 mL of 75 mM potassium chloride solution pre-warmed to 37°C for 10 minutes.
8. Centrifuge as in step 5 and discard supernatant.
9. Using a Pasteur pipette slowly add 6 to 8 mL of freshly prepared modified Carnoy's fixative (3 parts absolute methanol : 1 part glacial acetic acid) to the pellet while agitating constantly on a vortex mixer. Add the fixative dropwise at first, followed by a slow trickle to minimize cellular damage and formation of lumps.
10. Leave at room temperature for 10 minutes.
11. Centrifuge as in step 5 and remove the supernatant fluid as before and slowly add an additional 5 mL of fixative to resuspend pellet.
12. Repeat step 11 twice more, resuspending finally in 0.5 mL fixative. Use this cell suspension to prepare slides for examination. Care must be taken to avoid agitation of the cells.

### **C. Preparation of Slides**

1. Slides must be scrupulously clean. A suitable cleaning procedure is to soak the slides in chromic acid overnight, after which they should be washed in running water for at least half an hour and polished with a glass cloth.
2. Apply 1 or 2 drops of the resuspended cell preparation to the center of a glass slide from 3-4 inches above top of the slide and allow to spread.
3. Wipe excess fixative from the edges of the slide with filter paper.
4. At the first appearance of Newton's Rings, blow gently to speed final drying of the slide.
5. Stain with Giemsa and mount.

## **CLINICAL APPLICATIONS**

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

## **STORAGE AND STABILITY**

Store CHANG Medium MF frozen, below  $-10^{\circ}\text{C}$ , until ready to use. Chang Medium MF is stable until the expiration date shown on the bottle label when stored frozen. After thawing, any unused product can be dispensed into working aliquots and refrozen (maximum of two times) for later use, or tightly capped and stored at  $2-8^{\circ}\text{C}$  for up to 30 days. Protect from fluorescent light.

## **PRECAUTIONS AND WARNINGS**

This device is intended to be used by staff trained in procedures that include the indicated application for which the device is intended. CHANG Medium MF contains FBS and should be handled with universal laboratory precautions. The medium contains an antibiotic (gentamicin sulfate), to reduce the potential of bacterial contamination, but aseptic techniques should always be used when dispensing the media. Do not use any medium that is not red in color.



## INDIKATIONEN

Das CHANG Medium MF ist für die Kultivierung von peripherem Blut und anderen Proben für zytogenetische Analysen vorgesehen.

## PRODUKTBESCHREIBUNG

Das CHANG Medium MF ist ein gebrauchsfertiges Mitogen-Medium, bestehend aus RPMI mit 20 % FBS, 2 mM Glutamin, 20 mM HEPES-Puffer und dem Antibiotikum Gentamicinsulfat (35 µg/ml). Das CHANG Medium MF erfordert ggf. die Zugabe von Mitogenen, wie Phytohämagglutinin (PHA), um das Wachstum von peripheren Blut- und anderen Zellen zu optimieren. Die erforderliche Konzentration von PHA (oder anderen Mitogenen) sollte vom jeweiligen Labor bestimmt werden.

## INHALTSSTOFFE

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

## QUALITÄTSSICHERUNG

### STERILITÄT

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

Das resultierende Ergebnis kann durch mehrere Faktoren wie unter anderem durch Probenherkunft, Kulturbedingungen und Auswahl der Reagenzien beeinflusst werden. Es wird empfohlen, jede neue Reagenzcharge vor dem Einsatz im Routinebetrieb parallel mit Referenzmaterial bekannter geeigneter Aktivität zu analysieren.

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

## ERFORDERLICHE MATERIALIEN UND HILFSSTOFFE (NICHT IM LIEFERUMFANG)

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

## PROBENAHME UND HANDHABUNG

Der Erfolg von Vollblutkulturen für die zytogenetische Analyse wird durch die Gehalt an normal funktionierenden Lymphozyten zum Zeitpunkt der Probenahme beeinflusst. Da dieser Gehalt durch Infektionen und Medikamente beeinflusst werden kann, sollten Studienteilnehmer für zytogenetische Studien nach Möglichkeit 7 Tage lang keine Medikamente vor der Blutabnahme für Tests einnehmen. Ebenso kann es erforderlich sein, den Mitoseindex in den anergischen Phasen bestimmter Krankheiten (z. B. Morbus Hodgkin, Sarkoidose usw.) stark und bei gesunden Schwangeren in späteren Stadien der Schwangerschaft in geringerem Maße zu reduzieren. Es dürfen keine Konservierungsmittel zu Blutproben für die Lymphozytenkultur hinzugegeben werden. Aseptische Techniken sind unerlässlich.

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

## VORBEREITUNG

Das CHANG Medium MF 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 Calciumcarbonatkrystalle im CHANG Medium MF. Es gibt keine Hinweise, dass die Anwesenheit dieser Kristalle die Produktleistung beeinträchtigt.

## GEBRAUCHSANWEISUNG

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

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

### A. Vorbereitung von Vollblut-Mikrokulturen

1. 5–20 ml frisches Blut in phenolfreies Heparin abnehmen und durch Überkopfdrehen mischen.
2. Das PHA durch Zugabe von 5 ml sterilem destilliertem Wasser mit einer sterilen Spritze rekonstituieren.
3. Das erforderliche Volumen an CHANG Medium MF (Mikrokulturmedium) mit aseptischer Technik vorbereiten. Dazu pro Blutprobe 5 ml für jedes der beiden Zentrifugenröhrchen einplanen.
4. Das CHANG Medium MF in entsprechend gekennzeichnete sterile Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss füllen und mit aseptischer Technik 0,1 ml rekonstituiertes PHA zugeben.
5. Unmittelbar vor der Kultivierung 0,4 ml heparinisieretes Blut mit einer sterilen 1-ml-Pipette hinzugeben. Für Säuglinge und Kinder 0,3 ml Blut und für Schwangere 0,5 ml Blut verwenden.
6. Die Kulturen 72 Stunden bei 37 °C inkubieren. Für Proben von Säuglingen und Kindern kann eine der beiden Kulturen 48 Stunden bei 37 °C inkubiert werden. Für Schwangere kann eine der beiden Kulturen 96 Stunden bei 37 °C inkubiert werden. Den Inhalt jedes Röhrchen täglich durch Überkopfdrehen mischen.
7. 16–18 Stunden vor der Thymidin-Zugabe 0,05 ml (50 µl)/5 ml Arbeitslösung Methotrexat in jede Kultur geben.
8. Nach der Synchronisierung mit Methotrexat (5–6 Stunden vor Kulturgewinnung) 0,1 ml (100 µl)/5 ml Arbeitslösung Thymidin in jede Kultur geben.

### B. Kulturgewinnung

1. Erwärmen sie die hypotone Lösung (75 mM Kaliumchlorid) vor der Kulturgewinnung in einem 37 °C warmen Wasserbad.
2. 0,5 µl Colcemid-Lösung in jede Kultur geben.
3. Vorsichtig mischen und in den 37 °C warmen Inkubator zurückstellen.
4. Die Kulturen nach 30 Minuten aus dem Inkubator nehmen.
5. Die Kulturen 10 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 1.000 U/min zentrifugieren.
6. Den Überstand weitestgehend entfernen und entsorgen.
7. Das Pellet 10 Minuten lang in 6 bis 8 ml Kaliumchloridlösung 75 mM resuspendieren, die auf 37 °C vorgewärmt wurde.
8. Wie in Schritt 5 zentrifugieren und den Überstand entsorgen.
9. Mit einer Pasteurpipette langsam 6 bis 8 ml frisch zubereitetes, modifiziertes Carnoy-Fixiermittel (3 Teile absolutes Methanol: 1 Teil Eisessig) unter konstantem Schütteln auf einem Vortexmischer zu dem Pellet hinzu. Das Fixiermittel zunächst tropfenweise und dann langsam rieselnd hinzugeben, um Zellschäden und Klumpenbildung zu minimieren.
10. 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.
11. Wie in Schritt 5 zentrifugieren und überstehende Flüssigkeit wie zuvor entfernen. Dann weitere 5 ml Fixiermittel hinzugeben, um das Pellet zu resuspendieren.
12. Schritt 11 noch zweimal wiederholen und schließlich in 0,5 ml Fixiermittel resuspendieren. Diese Zellsuspension verwenden, um Objektträger für die Untersuchung vorzubereiten. Hierbei ist darauf zu achten, die Zellen möglichst nicht zu bewegen.

### C. Vorbereitung der Objektträger

1. Die Objektträger müssen absolut sauber sein. Ein geeignetes Reinigungsverfahren ist, die Objektträger über Nacht in Chromsäure einwirken zu lassen. Danach sollten sie mindestens eine halbe Stunde lang unter fließendem Wasser abgespült und mit einem Glastuch poliert werden.
2. 1 oder 2 Tropfen der resuspendierten Zellzubereitung in die Mitte am oberen Rand eines 8–10 cm langen (3–4 Zoll) Objektträgers träufeln und auseinanderlaufen lassen.



3. Überschüssiges Fixiermittel mit Filterpapier von den Rändern des Objektträgers abwischen.
4. Den Objektträger beim ersten Auftreten von Newtonschen Ringen leicht anpusten, um die Trocknung zu beschleunigen.
5. Mit Giemsa färben und einbetten.

#### **KLINISCHE ANWENDUNGSBEREICHE**

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

#### **LAGERUNG UND STABILITÄT**

Das CHANG Medium MF bis zur Verwendung tiefgekühlt unter  $-10\text{ °C}$  lagern. Bei Tiefkühl Lagerung ist das Chang Medium MF bis zu dem auf dem Flaschenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Nach dem Auftauen kann jedes unbenutzte Produkt in Arbeitsaliquote abgefüllt und zur späteren Verwendung wieder eingefroren (maximal zweimal) oder fest verschlossen und bei  $2\text{--}8\text{ °C}$  bis zu 30 Tage gelagert werden. Keinem Fluoreszenzlicht aussetzen.

#### **VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE**

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

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



**INDICAZIONI PER L'USO**

CHANG Medium MF è indicato per l'uso in colture di sangue periferico e altri campioni per analisi citogenetiche.

**DESCRIZIONE DEL DISPOSITIVO**

CHANG Medium MF è un terreno pronto all'uso, privo di mitogeno, composto da RPMI contenente il 20% di siero bovino fetale, 2 mM di glutammina, 20 mM di tampone HEPES e l'antibiotico gentamicina solfato (35 µg/ml). CHANG Medium MF potrebbe richiedere l'aggiunta di agenti mitogeni, come la fitoemagglutina (PHA) per ottimizzare la crescita delle cellule da sangue periferico e di altre cellule. La concentrazione richiesta di PHA (o altri mitogeni) deve essere stabilita dal laboratorio.

**COMPONENTI**Aminoacidi

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

Acqua

Qualità WFI (acqua per iniezioni)  
Proteine, ormoni e fattori di crescita  
Siero bovino fetale  
Indicatore di pH  
Rosso fenolo

Altro

Biotina  
Idrossiprolina  
Glutazione  
Tamponi  
Bicarbonato di sodio  
HEPES  
Substrati energetici  
Glucosio  
Inositolo

Sali e ioni

Cloruro di sodio  
Cloruro di colina  
Nitrato di calcio  
Cloruro di potassio  
Solfato di magnesio  
Fosfato di sodio  
Antibiotico  
Gentamicina solfato  
Vitamine ed elementi in tracce  
Acido folico  
Nicotinamide  
Riboflavina  
Tiamina  
Acido pantotenico  
Cobalamina  
Piridossina  
Acido aminobenzoico

**GARANZIA DI QUALITÀ****STERILITÀ**

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

Diversi fattori, tra cui l'origine dei campioni, le condizioni di coltura e la scelta dei reagenti, possono influenzare il risultato ottenuto. Quando si introduce un nuovo lotto di reagenti, prima di adottarlo nell'uso di routine, è consigliabile usarlo in parallelo a materiale di riferimento avente idonea attività nota.

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

**MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI MA NON FORNITI**

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

## PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

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

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

## PREPARAZIONE PER L'USO

Scongelare CHANG Medium MF per una notte in frigorifero (2-8 °C) quindi miscelarlo 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 MF è un fenomeno normale. La presenza di questi cristalli non ha evidenziato effetti negativi sulle prestazioni del prodotto.

## ISTRUZIONI PER L'USO

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

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

### A. Preparazione di microcolture di sangue intero

1. Prelevare 5-20 ml di sangue fresco in eparina senza fenolo e miscelare invertendo la provetta.
2. Ricostituire la PHA aggiungendo 5 ml di acqua distillata sterile utilizzando una siringa sterile.
3. Usando tecniche in asepsi, preparare il volume richiesto di CHANG Medium MF (terreno per microcoltura) lasciando 5 ml per ognuna delle due provette per centrifuga per ogni campione di sangue.
4. Dispensare CHANG Medium MF nelle provette per centrifuga sterili con tappo a vite debitamente etichettate e aggiungere in condizioni di sterilità 0,1 ml di PHA ricostituita.
5. Appena prima dell'inizio della coltura, aggiungere 0,4 ml di sangue eparinizzato mediante una pipetta sterile da 1 ml. Usare 0,3 ml di sangue per neonati e bambini e 0,5 ml per donne gravide.
6. Incubare le colture a 37 °C per 72 ore. Per campioni di neonati e bambini, incubare una delle due colture a 37 °C per 48 ore. Per campioni di donne gravide, una delle due colture può essere incubata a 37 °C per 96 ore. Miscelare per inversione quotidianamente.
7. Aggiungere 0,05 ml (50 µl)/5 ml di soluzione utile di metotressato a ogni coltura 16-18 ore prima dell'aggiunta di timidina.
8. Aggiungere 0,1 ml (100 µl)/5 ml di soluzione utile di timidina a ogni coltura dopo aver completato la sincronizzazione con metotressato (5-6 ore prima della raccolta).

### B. Raccolta delle colture

1. Preriscaldare la soluzione ipotonica (75 mM di cloruro di potassio) in bagno d'acqua a 37 °C prima della raccolta.
2. Aggiungere 0,5 µl di soluzione di Colcemid a ogni coltura.
3. Miscelare delicatamente e incubare nuovamente a 37 °C.
4. Rimuovere le colture dall'incubatore dopo 30 minuti.
5. Centrifugare le colture in una centrifuga da banco a 1000 giri/min per 10 minuti.
6. Rimuovere la maggior parte del liquido surnatante e gettarlo.
7. Sospendere nuovamente il pellet in 6-8 ml di soluzione di cloruro di potassio 75 mM preriscaldata a 37 °C per 10 minuti.
8. Centrifugare come da punto 5 ed eliminare il surnatante.
9. Con una pipetta Pasteur aggiungere delicatamente 6-8 ml di fissativo di Carnoy modificato appena preparato (3 parti di metanolo assoluto: 1 parte di acido acetico glaciale) al pellet, mescolando costantemente nel miscelatore Vortex. Aggiungere il fissativo inizialmente goccia per goccia, quindi in quantità leggermente maggiore per ridurre al minimo il danno cellulare e la formazione di grumi.
10. Lasciare a temperatura ambiente per 10 minuti.
11. Centrifugare come da punto 5 e rimuovere il liquido surnatante come prima, quindi aggiungere altri 5 ml di fissativo per sospendere nuovamente il pellet.
12. Ripetere il punto 11 altre due volte, infine sospendere di nuovo in 0,5 ml di fissativo. Usare questa sospensione cellulare per preparare i vetrini per l'esame. Prestare attenzione a evitare di scuotere le cellule.

### C. Preparazione dei vetrini

1. I vetrini devono essere puliti scrupolosamente. Un procedimento di pulizia adeguato consiste nell'immergerli in acido cromico per una notte, quindi lavarli sotto acqua corrente per almeno mezz'ora, e infine lucidarli con un panno per vetri.
2. Applicare 1 o 2 gocce di preparazione cellulare risospesa al centro del vetrino lasciandole cadere da 8-10 cm (3-4 pollici) sul vetrino stesso, quindi lasciare che la preparazione si distribuisca.
3. Rimuovere il fissativo in eccesso dai bordi del vetrino con carta da filtro.
4. Non appena compaiono gli anelli di Newton, soffiare delicatamente per accelerare l'asciugatura finale.
5. Colorare con Giemsa e montare.

## **APPLICAZIONI CLINICHE**

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

## **CONSERVAZIONE E STABILITÀ**

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

## **PRECAUZIONI E AVVERTENZE**

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

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



## INDICACIÓN DE USO

El CHANG Medium MF está diseñado para ser utilizado en el cultivo de sangre periférica y otras muestras para análisis citogenéticos.

## DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El CHANG Medium MF es un medio exento de mitógenos, listo para usar, compuesto por RPMI que contiene 20 % de FBS, glutamina 2 mM, tampón HEPES 20 mM y el antibiótico sulfato de gentamicina (35 µg/ml). El CHANG Medium MF puede requerir la adición de agentes mitógenos, como fitohemaglutinina (PHA), para optimizar el crecimiento de la sangre periférica y otras células. La concentración requerida de PHA (u otros mitógenos) la determinará cada laboratorio.

## COMPONENTES

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

## GARANTÍA DE CALIDAD

### ESTERILIDAD

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

Diversos factores, entre ellos la fuente de las muestras, las condiciones de cultivo y la selección de los reactivos, pueden influir en el resultado obtenido. Se aconseja a los usuarios que procesen cada nuevo lote de reactivo en paralelo con un material de referencia de actividad idónea y conocida antes de su adopción sistemática.

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

## MATERIAL Y EQUIPO NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

## RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

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

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

## PREPARACIÓN PARA EL USO

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

## INSTRUCCIONES DE USO

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

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

### A. Preparación de microcultivos de sangre total

1. Recoger 5-20 ml de sangre fresca en heparina sin fenol y mezclar por inversión.
2. Reconstituir la PHA añadiendo 5 ml de agua destilada estéril con una jeringa estéril.
3. Aplicando una técnica aséptica, preparar el volumen requerido del CHANG Medium MF (medio de microcultivo); en cada uno de los dos tubos de centrifuga se pueden verter 5 ml por muestra de sangre.
4. Dispensar el CHANG Medium MF a tubos de centrifuga estériles con tapón de rosca debidamente rotulados y añadir en condiciones asépticas 0,1 ml de la PHA reconstituida.
5. Inmediatamente antes del cultivo, añadir 0,4 ml de sangre heparinizada usando una pipeta estéril de 1 ml. Utilizar 0,3 ml de sangre de lactantes y niños y 0,5 ml de mujeres embarazadas.
6. Incubar los cultivos a 37 °C durante 72 horas. En el caso de las muestras de lactantes y niños, incubar uno de los dos cultivos a 37 °C durante 48 horas. En el de las mujeres embarazadas, uno de los dos cultivos se puede incubar a 37 °C durante 96 horas. Mezclar cada tubo por inversión a diario.
7. Añadir 0,05 ml (50 µl)/5 ml de la solución de trabajo de metotrexato a cada cultivo 16-18 horas antes de la adición de timidina.
8. Añadir 0,1 ml (100 µl)/5 ml de la solución de trabajo de timidina a cada cultivo después de completar la sincronización con metotrexato (5-6 horas antes de la cosecha).

### B. Cosecha de los cultivos

1. Precalentar la solución hipotónica (cloruro potásico 75 mM) en un baño de agua a 37 °C antes de la cosecha.
2. Añadir 0,5 µl de la solución Colcemid a cada cultivo.
3. Mezclar con suavidad e introducir de nuevo en la incubadora a 37 °C.
4. Sacar los cultivos de la incubadora al cabo de 30 minutos.
5. Centrifugar los cultivos en una centrifuga de mesa a 1.000 rpm durante 10 minutos.
6. Aspirar la mayor parte del líquido sobrenadante y desecharlo.
7. Resuspender el sedimento en 6 a 8 ml de la solución de cloruro potásico 75 mM precalentada a 37 °C durante 10 minutos.
8. Centrifugar como en el paso 5 y desechar el sobrenadante.
9. Con una pipeta Pasteur, añadir lentamente de 6 a 8 ml de fijador de Carnoy modificado recién preparado (3 partes de metanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial) al sedimento sin dejar de agitar en un vórtex. Añadir el fijador gota a gota al principio y luego en un goteo lento para minimizar el daño celular y la formación de grumos.
10. Dejar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
11. Centrifugar como en el paso 5 y aspirar el líquido sobrenadante como antes y añadir lentamente 5 ml más de fijador para resuspender el sedimento.
12. Repetir el paso 11 dos veces más, resuspendiendo finalmente en 0,5 ml de fijador. Utilizar esta suspensión celular para preparar los portaobjetos para su examen. Procurar no agitar las células.

### C. Preparación de los portaobjetos

1. Los portaobjetos deben estar impolutos. Un procedimiento de limpieza adecuado consiste en sumergir los portaobjetos en ácido crómico durante la noche y luego lavarlos en agua corriente durante al menos media hora y pulirlos con un paño de vidrio.
2. Desde una altura de 8 a 10 cm (3-4 in) aplicar y extender 1 o 2 gotas de la preparación celular resuspendida sobre el centro de un portaobjetos de vidrio.
3. Con papel de filtro limpiar el exceso de fijador de los bordes del portaobjetos.
4. Cuando empiecen a aparecer los anillos de Newton, soplar con suavidad para acelerar el secado final del portaobjetos.
5. Teñir con Giemsa y montar.



## **APLICACIONES CLÍNICAS**

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

## **CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD**

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

## **PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS**

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

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



**INDICATION D'UTILISATION**

CHANG Medium MF est destiné à être utilisé dans la culture des cellules de sang périphérique et d'autres échantillons aux fins d'analyses cytogénétiques.

**DESCRIPTION DU DISPOSITIF**

CHANG Medium MF est un milieu non mitogène prêt à l'emploi, composé de RPMI contenant 20 % de SVF, 2 mM de glutamine, 20 mM de tampon d'HEPES et 35 µg/ml de sulfate de gentamicine (antibiotique). CHANG Medium MF peut nécessiter l'ajout d'agents mitogènes, comme de la phytohémagglutinine (PHA), pour optimiser la croissance des cellules de sang périphérique et autres. La concentration requise de PHA (ou d'autres mitogènes) doit être déterminée par chaque laboratoire.

**COMPOSANTS**

<u>Acides aminés</u>	<u>Eau</u>	<u>Sels et ions</u>
Arginine	Qualité WFI	Chlorure de sodium
Asparagine	<u>Protéines, hormones et facteurs de croissance</u>	Chlorure de choline
Acide aspartique	<u>de croissance</u>	Nitrate de calcium
Cystine	Sérum de veau fœtal (SVF)	Chlorure de potassium
Acide glutamique	<u>Indicateur de pH</u>	Sulfate de magnésium
Glutamine	Rouge de phénol	Phosphate de sodium
Glycine	<u>Autre</u>	<u>Antibiotique</u>
Histidine	Biotine	Sulfate de gentamicine
Isoleucine	Hydroxyproline	<u>Vitamines et oligo-éléments</u>
Leucine	Glutathione	Acide folique
Lysine	<u>Tampons</u>	Nicotinamide
Méthionine	Bicarbonate de sodium	Riboflavine
Phénylalanine	HEPES	Thiamine
Proline	<u>Substrats énergétiques</u>	Acide pantothénique
Sérine	Glucose	Cobalamine
Thréonine	Inositol	Pyridoxine
Tryptophane		Acide aminobenzoïque
Tyrosine		
Valine		

**ASSURANCE QUALITÉ**

**STÉRILITÉ**

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

Plusieurs facteurs, y compris la source des échantillons, l'état des cultures et le choix des réactifs, peuvent influencer le résultat obtenu. Il est conseillé de traiter chaque nouveau lot de réactif parallèlement au matériau de référence présentant une activité appropriée connue avant de commencer à utiliser le milieu de façon régulière.

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

**MATÉRIAUX ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS**

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

## COLLECTE ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS

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

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

## PRÉPARATION

CHANG Medium MF 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 MF. Rien n'indique que la présence de ces cristaux ne compromette les performances du produit.

## MODE D'EMPLOI

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

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

### A. Préparation de microcultures de sang entier

1. Déposer 5 à 20 ml de sang frais dans de l'héparine sans phénol et renverser le tube pour bien mélanger.
2. Reconstituer la solution de PHA en ajoutant 5 ml d'eau distillée stérile à l'aide d'une seringue stérile.
3. À l'aide d'une technique aseptique, préparer le volume nécessaire de CHANG Medium MF (milieu de microculture), soit 5 ml pour chacun des deux tubes de centrifugation par échantillon de sang.
4. Répartir CHANG Medium MF dans les tubes de centrifugation stériles, à bouchons vissés, identifiés correctement, puis ajouter 0,1 ml de PHA reconstitué en utilisant une technique aseptique.
5. Immédiatement avant la culture, ajouter 0,4 ml de sang hépariné à l'aide d'une pipette stérile de 1 ml. Utiliser 0,3 ml de sang pour les nourrissons et les enfants et 0,5 ml pour les femmes enceintes.
6. Incuber les cultures à 37 °C pendant 72 heures. Pour les échantillons de nourrissons et d'enfants, incuber une des deux cultures à 37 °C pendant 48 heures. Pour les femmes enceintes, une des deux cultures peut être incubée à 37 °C pendant 96 heures. Renverser chaque tube une fois par jour pour bien mélanger le contenu.
7. Ajouter 0,05 ml (50 µl)/5 ml de solution de méthotrexate de travail à chaque culture 16 à 18 heures avant l'ajout de thymidine.
8. Ajouter 0,1 ml (100 µl)/5 ml de solution de thymidine de travail à chaque culture une fois la synchronisation du méthotrexate terminée (5 à 6 heures avant la collecte).

### B. Collecte des cultures

1. Préchauffer la solution hypotonique (75 mM de chlorure de potassium) dans un bain-marie à 37 °C avant la collecte.
2. Ajouter 0,5 µl d'une solution de démecolcine à chaque culture.
3. Mélanger délicatement et remettre la solution dans l'étuve à 37 °C.
4. Sortir les cultures de l'étuve au bout de 30 minutes.
5. Centrifuger les cultures dans une centrifugeuse de table à 1 000 tr/min pendant 10 minutes.
6. Prélèver la plupart du liquide surnageant, puis le jeter.
7. Remettre le culot en suspension dans 6 à 8 ml de solution de chlorure de potassium (75 mM) préchauffée à 37 °C pendant 10 minutes.
8. Centrifuger selon les instructions de l'étape 5 et jeter le surnageant.
9. À l'aide d'une pipette Pasteur, ajouter lentement 6 à 8 ml de solution de fixation de Carnoy modifiée fraîchement préparée (3 parts de méthanol absolu/1 part d'acide acétique glacial) au culot tout en le remuant en permanence dans un vortex. Ajouter la solution de fixation goutte à goutte au départ, puis en mince filet pour minimiser la détérioration cellulaire et la formation de grumeaux.
10. Laisser à température ambiante pendant 10 minutes.
11. Centrifuger conformément aux instructions de l'étape 5 et prélever le liquide surnageant de la même manière qu'auparavant et ajouter lentement 5 ml de solution de fixation supplémentaire pour remettre le culot en suspension.
12. Répéter l'étape 11 à deux autres reprises, en remettant le milieu en suspension finale dans 0,5 ml de solution de fixation. Utiliser cette suspension cellulaire pour préparer les lames pour l'examen microscopique. Veiller à ne pas agiter les cellules.

### C. Préparation des lames

1. Les lames doivent être nettoyées minutieusement. Pour ce faire, laisser tremper les lames dans de l'acide chromique toute une nuit, puis les laver à l'eau courante pendant au moins une demi-heure. Les frotter ensuite avec un chiffon essuie-verre.
2. Déposer une à deux gouttes de préparation cellulaire remise en suspension au centre d'une lame en verre, 8 à 10 cm (3 à 4 po) au-dessus de la lame, et laisser la solution s'étaler.

3. Essuyer les bords de la lame avec du papier-filtre pour absorber l'excédant.
4. À la première apparition des anneaux de Newton, souffler légèrement pour accélérer le séchage de la lame.
5. Appliquer du colorant Giemsa et monter la lame.

### **APPLICATIONS CLINIQUES**

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

### **CONSERVATION ET STABILITÉ**

Conserver CHANG Medium MF congelé, en dessous de -10 °C, jusqu'à ce qu'il soit prêt à être utilisé. CHANG Medium MF est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon lorsqu'il est conservé conformément aux instructions. Après la décongélation, tout produit non entamé peut être réparti dans des aliquotes de travail et recongelé (deux fois maximum) pour une utilisation ultérieure, ou son flacon fermé hermétiquement et conservé entre 2 et 8 °C pendant 30 jours maximum. Protéger de la lumière fluorescente.

### **PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE**

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

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



## **INDICAÇÃO DE UTILIZAÇÃO**

O CHANG Medium MF destina-se a ser utilizado na cultura de sangue periférico e outros espécimes para fins de análise citogenética.

## **DESCRIÇÃO DO DISPOSITIVO**

O CHANG Medium MF é um meio livre de agentes mitogênicos, pronto a utilizar, constituído por RPMI contendo FBS a 20%, glutamina 2 mM, tampão HEPES 20 mM e o antibiótico sulfato de gentamicina (35 µg/ml). Pode ser necessário adicionar agentes mitogênicos, como a fito-hemaglutinina (PHA), ao CHANG Medium MF para otimizar o crescimento de células do sangue periférico e de outras células. A concentração de PHA (ou outros agentes mitogênicos) necessária deve ser determinada por cada laboratório.

## **COMPONENTES**

### Aminoácido

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

### Água

Qualidade WFI (água p/ preparações injetáveis)

### Proteínas, hormonas e fatores de crescimento

Soro bovino fetal (FBS)

### Indicador de pH

Vermelho de fenol

### Outro

Biotina  
Hidroxi prolina  
Glutaciona  
Tampões  
Bicarbonato de sódio  
HEPES

### Substratos energéticos

Glucose  
Inositol

### Sais e iões

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

### Antibiótico

Sulfato de gentamicina

### Vitaminas e oligoelementos

Ácido fólico  
Nicotinamida  
Riboflavina  
Tiamina  
Ácido pantoténico  
Cobalamina  
Piridoxina  
Ácido aminobenzoico

## **GARANTIA DE QUALIDADE**

### **ESTERILIDADE**

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

O resultado obtido pode ser influenciado por vários fatores que incluem a origem da amostra, as condições de cultura e a seleção dos reagentes. Antes da adoção em utilização de rotina, os utilizadores são aconselhados a analisar cada novo lote de reagente em paralelo com material de referência de atividade adequada conhecida.

Cada lote de CHANG Medium MF é avaliado utilizando sangue periférico relativamente ao índice mitótico e ao comprimento e à qualidade dos cromossomas, por comparação com um meio de controlo. Os resultados estão descritos no certificado de análise específico de cada lote.

## **MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS**

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

## **COLHEITA E MANUSEAMENTO DE ESPÉCIMES**

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

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

## **PREPARAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO**

O CHANG Medium MF deve ser descongelado no frigorífico (2 °C–8 °C), durante a noite, e depois misturado suavemente para assegurar a homogeneidade. Dispense asseticamente 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 MF. A presença destes cristais não demonstrou causar qualquer efeito prejudicial no desempenho do produto.

## **INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO**

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

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

### **A. Preparação de microculturas de sangue total**

1. Coleta 5 ml–20 ml de sangue fresco em heparina sem fenol e misture por inversão.
2. Reconstitua o PHA, adicionando 5 ml de água destilada estéril, utilizando uma seringa estéril.
3. Utilizando uma técnica assética, prepare o volume necessário de CHANG Medium MF (meio de microcultura), contabilizando 5 ml para cada um de dois tubos de centrífugadora por amostra de sangue.
4. Dispense o CHANG Medium MF em tubos de centrífugadora com tampa de rosca estéreis devidamente identificados e adicione asseticamente 0,1 ml de PHA reconstituído.
5. Imediatamente antes da cultura, adicione 0,4 ml de sangue heparinizado utilizando uma pipeta de 1 ml estéril. Utilize 0,3 ml de sangue para bebês e crianças e 0,5 ml para mulheres grávidas.
6. Incube as culturas a 37 °C durante 72 horas. Para amostras de bebês e crianças, incube uma das duas culturas a 37 °C durante 48 horas. Para mulheres grávidas, uma das duas culturas pode ser incubada a 37 °C durante 96 horas. Misture cada tubo por inversão diariamente.
7. Adicione 0,05 ml (50 µl)/5 ml de solução de trabalho de metotrexato a cada cultura, 16 a 18 horas antes da adição de timidina.
8. Adicione 0,1 ml (100 µl)/5 ml de solução de trabalho de timidina a cada cultura após a realização da sincronização de metotrexato (5 a 6 horas antes da colheita).

### **B. Colheita de culturas**

1. Antes da colheita, pré-aqueça a solução hipotónica (cloreto de potássio 75 mM) em banho-maria a 37 °C.
2. Adicione 0,5 µl de uma solução de colcemid a cada cultura.
3. Misture suavemente e volte a colocar na incubadora a 37 °C.
4. Retire as culturas da incubadora após 30 minutos.
5. Centrifugue as culturas numa centrífugadora de bancada a 1000 rpm durante 10 minutos.
6. Retire a maior parte do líquido sobrenadante e elimine.
7. Ressuspenda o *pellet* em 6 ml a 8 ml de solução de cloreto de potássio 75 mM pré-aquecida a 37 °C durante 10 minutos.
8. Centrifugue como no passo 5 e elimine o sobrenadante.
9. Utilizando uma pipeta de Pasteur, adicione lentamente 6 ml a 8 ml de fixador de Carnoy modificado recém-preparado (3 partes de metanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial) ao *pellet* enquanto agita constantemente num misturador de vórtice. Adicione primeiro o fixador gota a gota, deixando depois fluir lentamente para minimizar os danos celulares e a formação de aglomerados.
10. Deixe à temperatura ambiente durante 10 minutos.
11. Centrifugue como no passo 5, retire o líquido sobrenadante, tal como anteriormente, e adicione lentamente mais 5 ml de fixador para ressuspender o *pellet*.
12. Repita o passo 11 mais duas vezes, ressuspendendo por último em 0,5 ml de fixador. Utilize esta suspensão celular para preparar as lâminas para exame. Deve ter-se cuidado para evitar a agitação das células.

### **C. Preparação das lâminas**

1. As lâminas têm de ser escrupulosamente limpas. Um procedimento de limpeza adequado consiste em mergulhar as lâminas em ácido crómico durante a noite, período após o qual devem ser lavadas em água corrente durante, pelo menos, meia hora, sendo depois polidas com um pano de limpeza de vidros.
2. Aplique 1 ou 2 gotas da preparação de células ressuspensa no centro de uma lâmina de vidro, cerca de 8 cm–10 cm (3"–4") acima do topo da lâmina, deixando que se espalhe.



3. Limpe o excesso de fixador dos bordos da lâmina com papel de filtro.
4. Ao aparecerem os primeiros anéis de Newton, sobre suavemente para acelerar a secagem final da lâmina.
5. Core com Giemsa e aplique o meio de montagem.

### **APLICAÇÕES CLÍNICAS**

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

### **CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE**

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

### **PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS**

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

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



**ΕΝΔΕΙΞΗ ΧΡΗΣΗΣ**

Το CHANG Medium MF προορίζεται για χρήση στην καλλιέργεια περιφερικού αίματος και άλλων δειγμάτων με σκοπό την κυτταρογενετική ανάλυση.

**ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ**

Το CHANG Medium MF είναι ένα μέσο χωρίς μιτογόνο, έτοιμο για χρήση, που αποτελείται από RPM1 που περιέχει 20% FBS, 2 mM γλουταμίνη, 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα HEPES και το αντιβιοτικό θειική γενταμικίνη (35 µg/mL). Το CHANG Medium MF μπορεί να απαιτεί προσθήκη μιτογόνων παραγόντων, όπως φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA) για βελτιστοποίηση της ανάπτυξης περιφερικού αίματος και λοιπών κυττάρων. Η απαιτούμενη συγκέντρωση PHA (ή άλλων μιτογόνων) θα πρέπει να καθορίζεται από το εκάστοτε εργαστήριο.

**ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ**

Αμινοξύ	<u>Νερό</u>	<u>Άλατα και ιόντα</u>
Αργινίνη	Ποιότητα ενέσιμου ύδατος (WFI)	Χλωριούχο νάτριο
Ασπαργίνη	<u>Πρωτεΐνες, ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες</u>	Χλωριούχος χολίνη
Ασπαρτικό οξύ	Ορός από έμβρυο βοοειδών (FBS)	Νιτρικό ασβέστιο
Κυστίνη	<u>Δείκτης pH</u>	Χλωριούχο κάλιο
Γλουταμικό οξύ	Ερυθρό της φαινόλης	Θεικό μαγνήσιο
Γλουταμίνη	<u>Άλλα</u>	Φωσφορικό νάτριο
Γλυκίνη	Βιοτίνη	<u>Αντιβιοτικό</u>
Ιστιδίνη	Υδροξυπρολίνη	Θειική γενταμικίνη
Ισολευκίνη	Γλουταθειόνη	<u>Βιταμίνες και ιχνοστοιχεία</u>
Λευκίνη	<u>Ρυθμιστικά διαλύματα</u>	Φυλλικό οξύ
Λυσίνη	Διπτανθρακικό νάτριο	Νικοτιναμίδη
Μεθειονίνη	HEPES	Ριβοφλαβίνη
Φαινυλαλανίνη	<u>Ενεργειακά υποστρώματα</u>	Θειαμίνη
Προλίνη	Γλυκόζη	Παντοθενικό οξύ
Σερίνη	Ινοσιτόλη	Κοβαλαμίνη
Θρεονίνη		Πυριδοξίνη
Τρυπτοφάνη		Αμινοβενζοϊκό οξύ
Τυροσίνη		
Βαλίνη		

**ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ****ΣΤΕΙΡΟΤΗΤΑ**

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

Το αποτέλεσμα που λαμβάνεται μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως η προέλευση των δειγμάτων, οι συνθήκες καλλιέργειας και η επιλογή αντιδραστηρίων. Προτείνεται οι χρήστες να αναλύουν κάθε νέα παρτίδα αντιδραστηρίων παράλληλα με υλικό αναφοράς γνωστής, κατάλληλης δραστηριότητας, πριν από την υιοθέτηση σε χρήση ρουτίνας.

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

**ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ**

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

## ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

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

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ

Το CHANG Medium MF 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. Διανέμει με άσηπτες συνθήκες 10 mL μέσου σε αποστειρωμένα μπουκαλάκια καλλιέργειας και ισορροπήστε στους 37 °C για άμεση χρήση σε καλλιέργειες μελουό των οστών.

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

## ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

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

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

### A. Προετοιμασία μικροκαλλιέργειών ολικού αίματος

1. Συλλέξτε 5-20 mL φρέσκου αίματος σε ηπαρίνη χωρίς φαινόλη και αναμείξτε με αναστροφή.
2. Αναστατήστε το PHA προσθέτοντας 5 mL αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη σύριγγα.
3. Εφαρμόζοντας άσηπτη τεχνική, προετοιμάστε τον απαιτούμενο όγκο CHANG Medium MF (μέσο μικροκαλλιέργειας), αφήνοντας 5 mL για καθένα από τα δύο σωληνάρια φυγόκεντρου ανά δείγμα αίματος.
4. Διανέμει το CHANG Medium MF σε αποστειρωμένα σωληνάρια φυγόκεντρου με βιδωτό πώμα που φέρουν κατάλληλες ετικέτες και προσθέστε με άσηπτη τεχνική 0,1 mL ανασυσταμένου PHA.
5. Αμέσως πριν από την καλλιέργεια, προσθέστε 0,4 mL ηπαρισμένου αίματος, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη πιπέτα του 1 mL. Χρησιμοποιήστε 0,3 mL αίμα για βρέφη και παιδιά και 0,5 mL για έγκυες γυναίκες.
6. Επωάστε τις καλλιέργειες στους 37 °C για 72 ώρες. Για δείγματα βρεφών και παιδιών, επωάστε μία από τις δύο καλλιέργειες στους 37 °C για 48 ώρες. Για έγκυες γυναίκες, η μία από τις δύο καλλιέργειες μπορεί να επωαστεί στους 37 °C για 96 ώρες. Αναμιγνύετε κάθε σωληνάριο με αναστροφή καθημερινά.
7. Προσθέστε 0,05 mL (50 μL)/5 mL διαλύματος εργασίας μεθοτρεξάτης σε κάθε καλλιέργεια, 16-18 ώρες πριν από την προσθήκη θυμιδίνης.
8. Προσθέστε 0,1 mL (100 μL)/5 mL διαλύματος εργασίας θυμιδίνης σε κάθε καλλιέργεια μετά την ολοκλήρωση του συγχρονισμού της μεθοτρεξάτης (5-6 ώρες πριν από τη συλλογή).

### B. Συλλογή καλλιέργειών

1. Προθερμάνετε το υποτονικό διάλυμα (75 mM χλωριούχο κάλιο) σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37 °C πριν από τη συλλογή.
2. Προσθέστε 0,5 mL διαλύματος κολοσεμίδης σε κάθε καλλιέργεια.
3. Αναμείξτε με ήπιες κινήσεις και επιστρέψτε σε επωαστήρα στους 37 °C.
4. Αφαιρέστε τις καλλιέργειες από τον επωαστήρα μετά από 30 λεπτά.
5. Φυγοκεντρίστε τις καλλιέργειες σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στις 1.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά.
6. Αφαιρέστε την πλειονότητα του υπερκείμενου υγρού και απορρίψτε την.
7. Επαναλάβετε την εναιώρηση του συσσωματώματος σε 6 έως 8 mL διαλύματος χλωριούχου καλίου 75 mM που έχει προθερμανθεί στους 37 °C για 10 λεπτά.
8. Φυγοκεντρίστε όπως στο βήμα 5 και απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό.
9. Χρησιμοποιώντας πιπέτα Παστέρ, προσθέστε αργά 6 έως 8 mL πρόσφατα παρασκευασμένου, τροποποιημένου μέσου μονιμοποίησης Carnoy (3 μέρη απόλυτης μεθανόλης: 1 μέρος παγόμορφου οξικού οξέος) στο συσσωμάτωμα, ενόσω αναδεύετε συνεχώς σε αναμικτή στροβιλισμού. Προσθέστε το μέσο μονιμοποίησης υπό μορφή σταγόνων στην αρχή και, στη συνέχεια, με αργή ροή, για να ελαχιστοποιήσετε την κυτταρική βλάβη και τον σχηματισμό θρόμβων.
10. Αφήστε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
11. Φυγοκεντρίστε όπως στο βήμα 5 και αφαιρέστε το υπερκείμενο υγρό όπως προηγουμένως και προσθέστε αργά ακόμη 5 mL μέσου μονιμοποίησης για να επαναλάβετε την εναιώρηση του συσσωματώματος.
12. Επαναλάβετε το βήμα 11 άλλες δύο φορές, επαναλαμβάνοντας την εναιώρηση τελικά σε μέσο μονιμοποίησης 0,5 mL. Χρησιμοποιήστε αυτό το κυτταρικό εναιώρημα για να προετοιμάσετε τις αντικειμενοφόρες πλάκες για εξέταση. Πρέπει να προσέξετε να αποφύγετε την ανάδευση των κυττάρων.

## **Γ. Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών**

1. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες πρέπει να είναι σχολαστικά καθαρές. Μια κατάλληλη διαδικασία καθαρισμού είναι η εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων πλακών σε χρωμικό οξύ κατά τη διάρκεια της νύχτας και μετά έκπλυση σε τρεχούμενο νερό για τουλάχιστον μισή ώρα και γυάλισμα με πανί καθαρισμού γυάλινων επιφανειών.
2. Εφαρμόστε στο κέντρο μιας γυάλινης αντικειμενοφόρου πλάκας 1 ή 2 σταγόνες του επανειναιωρημένου κυτταρικού παρασκευάσματος από απόσταση 8-10 cm (3-4 ιντσών) από το πάνω μέρος της αντικειμενοφόρου πλάκας και αφήστε να απλωθεί.
3. Σκουπίστε την περίσσεια του μέσου μονιμοποίησης από τις άκρες της αντικειμενοφόρου πλάκας με διηθητικό χαρτί.
4. Με την πρώτη εμφάνιση δακτυλίων του Newton, φυσήξτε ήπια για να επιταχυνθεί το τελικό στέγνωμα της αντικειμενοφόρου πλάκας.
5. Εκτελέστε χρώση με Giemsa και εγκλείστε.

## **ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

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

## **ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ**

Φυλάσσετε το CHANG Medium MF κατεψυγμένο, κάτω από τους -10 °C, μέχρι να είστε έτοιμοι να το χρησιμοποιήσετε. Το Chang Medium MF είναι σταθερό έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα της φιάλης, όταν φυλάσσεται κατεψυγμένο. Μετά την απόψυξη, τυχόν μη χρησιμοποιημένο προϊόν μπορεί να διανεμηθεί σε κλάσματα εργασίας και να επανακαταψυχθεί (το μέγιστο δύο φορές) για επακόλουθη χρήση ή να πωματιστεί σφικτά και να φυλαχθεί στους 2-8 °C, για έως και 30 ημέρες. Προστατέψτε το από φθορίζον φως.

## **ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ**

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

Το CHANG Medium MF περιέχει FBS και ο χειρισμός του θα πρέπει να γίνεται με τη λήψη των γενικών εργαστηριακών προφυλάξεων. Το μέσο περιέχει ένα αντιβιοτικό (θειική 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.



## INDIKACE PRO POUŽITÍ

CHANG Medium MF je určeno k použití při kultivaci periferní krve a jiných vzorků pro účely cytogenetické analýzy.

## POPIS PROSTRĚDKU

CHANG Medium MF je médium bez obsahu mitogenů připravené k použití, které se skládá z RPMI o obsahu 20 % FBS, 2 mM glutaminu, 20 mM pufru HEPES a antibiotika gentamicin-sulfátu (35 µg/ml). Do média CHANG Medium MF může být potřeba k optimalizaci růstu buněk periferní krve a jiných buněk přidat mitogenní činidla, jako např. fytohemaglutinin (PHA). Požadovanou koncentraci PHA (nebo jiných mitogenů) stanoví jednotlivé laboratoře.

## SLOŽKY

### Aminokyselina

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

### Voda

V kvalitě vody pro injekci  
Proteiny, hormony a růstové faktory  
Fetální bovinní sérum (FBS)  
Indikátor pH  
Fenolová červeň  
Ostatní  
Biotin  
Hydroxyprolin  
Glutathion  
Puřry  
Hydrogenuhlíčitán sodný  
HEPES  
Energetické substráty  
Glukóza  
Inositol

### Soli a ionty

Chlorid sodný  
Cholinchlorid  
Dusičnan vápenatý  
Chlorid draselný  
Síran hořečnatý  
Fosforečnan sodný  
Antibiotikum  
Gentamicin-sulfát  
Vitaminy a stopové prvky  
Kyselina listová  
Nikotinamid  
Riboflavin  
Thiamin  
Kyselina pantothenová  
Kobalamin  
Pyridoxin  
Kyselina aminobenzoová

## ZAJIŠTĚNÍ KVALITY

### STERILITA

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

Dosažené výsledky může ovlivnit několik faktorů včetně zdroje vzorku, podmínek kultivace a výběru reagensů. Doporučujeme uživateli, aby každou novou šarži reagensie před přijetím k rutinnímu používání zpracovávali paralelně s referenčním materiálem o známé odpovídající aktivitě.

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

## POTŘEBNÉ NEDODÁVANÉ MATERIÁLY A VYBAVENÍ

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

## **ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE S NIMI**

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

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

## **PŘÍPRAVA K POUŽITÍ**

CHANG Medium MF 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 ekvilibruje na 37 °C k okamžitému použití ke kultivaci kostní dřeně.

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

## **NÁVOD K POUŽITÍ**

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

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

### **A. Příprava mikrokultur z plně krve**

1. Odeberte 5–20 ml čerstvé krve do zkumavky s heparinem bez obsahu fenolu a promíchejte převrácením.
2. Rekonstituujte PHA přidáním 5 ml sterilní destilované vody sterilní stříkačkou.
3. Asepticky připravte potřebný objem CHANG Medium MF (mikrokultivačního média), 5 ml na každou ze dvou centrifugačních zkumavek na krevní vzorek.
4. Nadávkuje CHANG Medium MF do řádně označených sterilních centrifugačních zkumavek se šroubovacím uzávěrem a asepticky přidejte 0,1 ml rekonstituovaného PHA.
5. Bezprostředně před kultivací přidejte sterilní 1 ml pipetou 0,4 ml heparinované krve. Použijte 0,3 ml krve pro děti a 0,5 ml pro těhotné ženy.
6. Kultury inkubujte při teplotě 37 °C po dobu 72 hodin. U vzorků dětí inkubujte jednu ze dvou kultur při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. U těhotných žen lze jednu ze dvou kultur inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 96 hodin. Zkumavky každý den promíchejte převrácením.
7. Do každé kultury přidejte 16–18 hodin před přidáním thymidinu 0,05 ml (50 µl)/5 ml pracovního roztoku methotrexátu.
8. Po dokončení synchronizace methotrexátu (5–6 hodin před sběrem) přidejte do každé kultury 0,1 ml (100 µl)/5 ml pracovního roztoku thymidinu.

### **B. Sběr kultur**

1. Před sběrem předejte hypotonický roztok (chlorid draselný 75 mM) ve vodní lázni o teplotě 37 °C.
2. Do každé kultury přidejte 0,5 µl roztoku Colcemid.
3. Jemně promíchejte a vraťte do inkubátoru o teplotě 37 °C.
4. Po 30 minutách kultury vyjměte z inkubátoru.
5. Odstředte kultury ve stolní centrifuzě při 1 000 ot./min po dobu 10 minut.
6. Odstraňte a zlikvidujte většinu supernatantu.
7. Resuspendujte pelet v 6 až 8 ml roztoku chloridu draselného 75 mM předeřhátém na 37 °C po dobu 10 minut.
8. Odstředte jako v kroku 5 a odstraňte supernatant.
9. Pastevou pipetou pomalu k peletu za neustálého míchání na třepače vortex přidejte 6 až 8 ml čerstvého připraveného modifikovaného Carnoyova fixačního roztoku (3 díly absolutního methanolu : 1 díl kyseliny octové ledové). Fixační roztok nejprve přidávejte po kapkách, potom tenkým pramínkem, abyste minimalizovali poškození buněk a tvorbu hrudek.
10. Nechte při pokojové teplotě po dobu 10 minut.
11. Odstředte jako v kroku 5, odstraňte supernatant jako dříve a pomalým přidáním dalších 5 ml fixačního roztoku resuspendujte pelet.
12. Krok 11 ještě dvakrát opakujte s konečným resuspendováním v 0,5 ml fixačního roztoku. Tuto buněčnou suspenzi použijte k přípravě sklíček k vyšetření. Dbejte, aby nedošlo k většímu pohybu buněk.

### **C. Příprava sklíček**

1. Sklíčka musí být dokonale čistá. Vhodným postupem čištění je namočit sklíčka přes noc do kyseliny chromové, poté oplachovat pod tekoucí vodou přinejmenším půl hodiny a vyleštit látkou na sklo.
2. Kápněte 1 nebo 2 kapky resuspendovaných buněk na střed sklíčka z výšky 8–10 cm (3–4 palce) a nechte roztáhnout.
3. Filtračním papírem ze sklíčka otřete nadbytečný fixační roztok.
4. Jakmile se objeví Newtonovy kruhy, jemným zafoukáním urychlete konečné zaschnutí sklíčka.
5. Obarvíte Giemsovým barvivem a fixujete.



## **KLINICKÉ APLIKACE**

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

## **UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA**

CHANG Medium MF je třeba do použití uchovávat při teplotě nižší než  $-10^{\circ}\text{C}$ . Pokud je skladováno zmrazené, Chang Medium MF je stabilní do data expirace uvedeného na štítku lahve. Po rozmrazení lze všechny nespotebovaný výrobek rozdělit na díly používané při zpracování a znovu zmrazit (maximálně dvakrát) k pozdějšímu použití nebo pevně uzavřít a skladovat po dobu až 30 dní při teplotě  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Chraňte před fluorescenčním světlem.

## **BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A VAROVÁNÍ**

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

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



## INDIKATIONER FOR ANVENDELSE

CHANG Medium MF er beregnet til anvendelse ved dyrkning af perifert blod og andre prøver til cytogenetisk analyse.

## BESKRIVELSE AF PRODUKTET

CHANG Medium MF er et mitogenfrit, brugsklart medium, der består af RPMI, der indeholder 20 % FBS, 2 mM glutamin, 20 mM HEPES-buffer og antibiotikummet gentamicinsulfat (35 µg/ml). CHANG Medium MF kan kræve tilsættelse af mitogene stoffer, som f.eks. phytohemagglutinin (PHA), for at optimere væksten af perifert blod og andre celler. Den påkrævede koncentration af PHA (eller andre mitogene stoffer) skal fastlægges af det individuelle laboratorium.

## KOMPONENTER

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

## KVALITETSSIKRING

### STERILITET

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

Flere faktorer, herunder prøvekilde, kulturens tilstand og valg af reagenser, kan have indflydelse på de opnåede resultater. Brugere rådes til at køre hvert nyt reagensbatch parallelt med referencemateriale, der vides at have passende aktivitet, inden rutineanvendelse.

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

## NEDVENDIGE MATERIALER OG Udstyr, DER IKKE MEDFØLGER

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

## PRØVETAGNING OG KLARGØRING

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

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

## KLARGØRING

CHANG Medium MF 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 MF. Tilstedeværelsen af disse krystaller lader ikke til at forårsage nogen skadelig effekt på produktets ydeevne.

## BRUGSANVISNING

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

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

### A. Forberedelse af fuldblodsmikrokulturer

1. Indsaml 5-20 ml friskt blod i fenolfrit heparin, og bland det ved at vende det op og ned.
2. Rekonstituer PHA ved at tilsætte 5 ml sterilt, destilleret vand med en steril sprøjte.
3. Anvend aseptisk teknik og forbered den nødvendige volumen CHANG Medium MF (mikrokulturmedium), så der er 5 ml til hvert af to centrifugerør pr. blodprøve.
4. Dispenser CHANG Medium MF i behørigt mærkede, sterile centrifugerør med skruelåg, og tilsæt aseptisk 0,1 ml restitueret PHA.
5. Umiddelbart inden dyrkning tilsættes 0,4 ml hepariniseret blod med en steril 1 ml pipette. Anvend 0,3 ml blod til spædbørn og børn og 0,5 ml til gravide kvinder.
6. Inkuber kulturerne ved 37 °C i 72 timer. Inkuber en af de to kulturer ved 37 °C i 48 timer til spædbørns- og børneprøver. Til gravide kvinder kan en af de to kulturer inkuberes ved 37 °C i 96 timer. Bland hvert rør dagligt ved at vende det op og ned.
7. Tilsæt 0,05 ml (50 µl)/5 ml arbejdsopløsning af methotrexat til hver kultur 16-18 timer før tilsætning af thymidin.
8. Tilsæt 0,1 ml (100 µl)/5 ml arbejdsopløsning af thymidin til hver kultur efter synkronisering af methotrexat (5-6 timer før høst).

### B. Høst af kulturerne

1. Forvarm den hypotoniske opløsning (75 mM kaliumklorid) i et 37 °C vandbad inden høst.
2. Tilsæt 0,5 µl Colcemid-opløsning til hver kultur.
3. Bland forsigtigt, og sæt dem tilbage i inkubatoren på 37 °C.
4. Tag kulturerne ud af inkubatoren efter 30 minutter.
5. Centrifuger kulturerne i en bordcentrifuge ved 1.000 o/min. i 10 minutter.
6. Fjern det meste af supernatanten og bortskaf den.
7. Resuspender pelleten i 6-8 ml 75 mM kaliumkloridopløsning, der er forvarmet til 37 °C, i 10 minutter.
8. Centrifuger som i trin 5, og bortskaf supernatanten.
9. Tilsæt langsomt 6 til 8 ml frisk klargjort modificeret Carnoys fiksering med en Pasteurpipette (3 dele absolut methanol: 1 del iseddikesyre) til pelleten, mens den konstant rystes på en vortexmixer. Tilsæt fikseringen dråbevis i starten, og derefter som en langsom piblen for at minimere celleskade og klumpdannelse.
10. Lad stå ved stuetemperatur i 10 minutter.
11. Centrifuger som i trin 5, fjern supernatanten som før, og tilsæt langsomt yderligere 5 ml fiksering for at resuspendere pelleten.
12. Gentag trin 11 to gange mere, og resuspender til sidst i 0,5 ml fiksering. Brug denne celleduspension til at klargøre objektglassene til undersøgelse. Udvis forsigtighed for at undgå, at cellerne rystes.

### C. Klargøring af objektglas

1. Objektglassene skal være pertentligt rene. En egnet rengøringsmetode er at lade objektglassene stå i blød i kromsyre natten over, hvorefter de skal vaskes under rindende vand i mindst en halv time og pusdes med en glasklud.
2. Sæt 1 eller 2 dråber af de klargjorte, resuspenderede celler midt på objektglasset fra 8 til 10 cm (3-4 tommes) over det øverste af objektglasset, og lad dem sprede sig.
3. Tør overskydende fiksering af objektglassets kanter med filterpapir.
4. Ved første forekomst af Newton-ringe pustes forsigtigt for at tørre objektglasset hurtigere.
5. Færdig med Giemsa og monteringsmedium.

## **KLINISKE APPLIKATIONER**

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

## **OPBEVARING OG STABILITET**

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

## **FORHOLDSREGLER OG ADVARSLER**

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

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



**KÄYTTÖAIHE**

CHANG Medium MF on tarkoitettu perifeerisen veren ja muiden näytteiden viljelemiseen sytogeneettistä analyysiä varten.

**VÄLINEEN KUVAUS**

CHANG Medium MF on mitogeenia sisältämätön käyttövalmis liuos, joka sisältää RPMI-elatusainetta, joka sisältää 20 % naudan sikiön seerumia, 2 mM glutamiinia, 20 mM HEPES-puskuria ja gentamysiinisulfaatti-antibioottia (35 µg/ml). CHANG Medium MF -liuokseen on ehkä lisättävä mitogeenisia aineita kuten fytohemagglutiinia (PHA) perifeerisen veren solujen ja muiden solujen kasvun optimoimiseksi. Yksittäisen laboratorion on määritettävä PHA:n (tai muiden mitogeenien) tarvittava pitoisuus.

**AINESOSAT**

<u>Aminohappo</u>	<u>Vesi</u>	<u>Suolat ja ionit</u>
arginiini	injektionesteisiin tarkoitettu	natriumkloridi
asparagiini	veden laatuinen	koliinikloridi
asparagiinihappo	<u>Proteiinit, hormonit ja kasvutekijät</u>	kalsiumnitraatti
kystiini	naudan sikiön seerumi (FBS)	kaliumpkloridi
glutamiinihappo	<u>pH-indikaattori</u>	magnesiumsulfaatti
glutamiini	fenolipuna	natriumfosfaatti
glysiini	<u>Muut</u>	<u>Antibiootti</u>
histidiini	biotiini	gentamysiinisulfaatti
isoleusiini	hydroksipropiiliini	<u>Vitamiinit ja hivenaineet</u>
leusiini	glutationi	foolihappo
lysiini	<u>Puskurit</u>	nikotiiniamidi
metioniini	natriumbikarbonaatti	riboflaviini
fenyylialaniini	HEPES	tiamiini
proliini	<u>Energiasubstraatit</u>	panteenihappo
seriini	glukoosi	kobalamiini
treoniini	inositoli	pyridoksiini
tryptofaani		aminobentsoiinihappo
tyrosiini		
valiini		

**LAADUNVARMENNUS****STERIILISYYS**

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

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

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

**TARVITTAVAT MATERIAALIT JA LAITTEISTOT, JOITA EI TOIMITETA MUKANA**

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

## NÄYTTEEN KERÄÄMINEN JA KÄSITTELY

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

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

## KÄYTÖN VALMISTELU

CHANG Medium MF 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 luuydinviljelmissä käyttämistä varten.

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

## KÄYTTÖOHJEET

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

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

### A. Kokoverimikroviljelmien valmistelu

1. Kerää 5–20 ml tuoretta verta fenolia sisältämättömään hepariiniin ja sekoita kääntelemällä.
2. Liuota PHA nesteeseen lisäämällä 5 ml steriiliä tislattua vettä steriilillä ruiskulla.
3. Valmista aseptisella menetelmällä tarvittava määrä CHANG Medium MF -liuosta (mikroviljelmän elatusainetta), laskien 5 ml kullekin kahdelle sentrifugiputkelle yhtä verinäytettä kohden.
4. Jaa CHANG Medium MF asianmukaisesti merkittyihin, steriileihin kierrekorkkisiin sentrifugiputkiin ja lisää aseptisesti 0,1 ml nesteeseen liuotettua PHA:ta.
5. Lisää juuri ennen viljelyä 0,4 ml heparinisoitua verta steriiliä 1 ml:n pipettiä käyttäen. Käytä 0,3 ml verta (vauvat ja lapset) tai 0,5 ml (raskaana olevat naiset).
6. Inkuboi viljelmiä 37 °C:ssa 72 tunnin ajan. Kun kyseessä on vauvojen ja lasten näytteet, inkuboi toista kahdesta viljelmästä 37 °C:ssa 48 tunnin ajan. Kun kyseessä on raskaana olevien naisten näytteet, toista kahdesta viljelmästä voidaan inkuboida 37 °C:ssa 96 tunnin ajan. Sekoita jokainen putki joka päivä kääntelemällä.
7. Lisää 0,05 ml (50 µl) metotrasaatin työskentelyliuosta / 5 ml näytettä jokaiseen viljelmään 16–18 tuntia ennen tyymiiniin lisäämistä.
8. Lisää 0,1 ml (100 µl) tyymiiniin työskentelyliuosta / 5 ml:n näyte jokaiseen viljelmään metotrekasaattisyntronoinnin jälkeen (5–6 tuntia ennen keräämistä).

### B. Viljelmien kerääminen

1. Esilämmitä hypotoninen liuos (75 mM kaliumkloridi) 37 °C:n vesihautteessa ennen keräämistä.
2. Lisää 0,5 µl Colcemid-liuosta kuhunkin viljelmään.
3. Sekoita varovasti ja palauta 37 °C:n lämpökaappiin.
4. Ota viljelmat lämpökaapista 30 minuutin jälkeen.
5. Sentrifugoi viljelmiä pöytäsentrifugissa nopeudella 1 000 rpm 10 minuutin ajan.
6. Poista suurin osa supernatantista ja hävitä se.
7. Uudelleensuspendoi pelletit 6–8 ml:aan 75 mM kaliumkloridiliuosta, jota on lämmitetty ennalta 37 °C:seen 10 minuutin ajan.
8. Sentrifugoi kuten vaiheessa 5 ja hävitä supernatanti.
9. Lisää hitaasti pasteuripetillä 6–8 ml juuri valmistettua muunneltua Carnoy-fiksatiivia (3 osaa absoluuttista metanolia : 1 osa jäätikkää) pellettiin, samalla kun putkea ravistellaan koko ajan Vortex-sekoittimessa. Lisää fiksatiivia ensin tiipoittain ja sitten hitaasti valuttamalla, jotta soluvauriot ja kokkareiden muodostuminen vältetään.
10. Anna seistä paikallaan huoneenlämmössä 10 minuutin ajan.
11. Sentrifugoi kuten vaiheessa 5 ja poista supernatanttineeste kuten aiemmin. Lisää hitaasti vielä 5 ml fiksatiivia pelletin uudelleensuspendoimiseksi.
12. Toista vaihe 11 vielä kahdesti. Uudelleensuspendoi lopulta 0,5 ml:aan fiksatiivia. Käytä tätä solususpensiota näytelasien valmistamiseen tutkimusta varten. Solujen ravistamista on huolella vältettävä.

### C. Näytelasien valmistaminen

1. Näytelasien on oltava moitteettoman puhtaita. Sopiva puhdistusmenetelmä on liottaa näytelaseja kromihapossa yön ajan, minkä jälkeen niitä on pestävä juoksevässä vedessä vähintään puolen tunnin ajan ja kiillotettava lasiilinaalla.
2. Lisää 1 tai 2 pisaraa resuspendoitua solupreparaattia näytelasin keskelle noin 8–10 cm (3–4 tuumaa) näytelasin yläosasta. Anna näytteen levitä.
3. Pyyhi ylimääräinen fiksatiivi näytelasin reunoilta suodatinpaperilla.
4. Kun Newtonin renkaat tulevat aluksi näkyviin, puhalla varovasti näytelasin lopullisen kuivumisen nopeuttamiseksi.
5. Värjää Giemsaalla ja lisää preparointiaine.



## **KLIINISET KÄYTÖT**

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

## **SÄILYTTÄMINEN JA STABILIUUS**

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

## **VAROITIMET JA VAROITUKSET**

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

CHANG Medium MF sisältää naudan sikiön seerumia, ja sitä on käsiteltävä laboratorion yleisiä varotoimia noudattaen. Liuos sisältää antibioottia (gentamysiinisulfaatti) bakteerikontaminaation mahdollisuuden vähentämiseksi, mutta liuosta jaettaessa on aina käytettävä aseptisia menetelmiä. Älä käytä mitään liuosta, joka ei ole väriltään punaista.



**LIETOŠANAS INDIKĀCIJA**

„CHANG Medium MF” (Čanga barotne MF) ir paredzēta lietošanai perifēro asiņu šūnu un citu paraugu kultivēšanai, lai veiktu to citogēnētiskās analīzes.

**IERĪCES APRAKSTS**

„CHANG Medium MF” ir lietošanai gatava barotne bez mitogēniem, tās sastāvā ir RPMI, kas satur 20 % liellopu embriju seruma (FBS), 2 mM glutamīna, 20 mM HEPES buferšķīduma un antibiotiku gentamicīna sulfātu (35 µg/ml). „CHANG Medium MF” var būt nepieciešams pievienot mitogēnus līdzekļus, piemēram, fitohemaglutīnu (PHA), lai optimizētu perifēro asiņu un citu šūnu augšanu. Nepieciešamā fitohemaglutīna (PHA) koncentrācija jānosaka konkrētajā laboratorijā.

**SASTĀVDAĻAS**

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

**KVALITĀTES NODROŠINĀŠANA****STERILITĀTE**

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

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

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

**NEPIECIEŠAMIE, BET NEIETVERTIE MATERIĀLI**

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

## PARAUGU ŅEMŠANA UN SAGATAVOŠANA

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

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

## SAGATAVOŠANA LIETOŠANAI

„CHANG Medium MF” pa nakti jāatstāj ledusskapī (2–8 °C) atkausēšanai, pēc tam uzmanīgi jāsamaisa, lai nodrošinātu viendabīgumu. Aseptiski dozējiet 10 ml barotnes sterilos kultūras flakonos no nostabilizējiem 37 °C temperatūrā tūlītējai izmantošanai kaulu smadzeņu kultūrās.

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

## LIETOŠANAS NORĀDĪJUMI

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

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

### A. Pilnasiņu mikrokultūru sagatavošana

1. Iepildiet 5–20 ml svaigu asiņu fenolu nesaturīgu heparinā un samaisiet, apvēršot otrādi.
2. Sagatavojiet PHA, ar sterilu šļirci pievienojot 5 ml sterila, destilēta ūdens.
3. Aseptiskā veidā sagatavojiet nepieciešamo „CHANG Medium MF” (mikrokultūras barotnes) daudzumu, paredzot 5 ml katram no abiem centrifūgas stobriņiem uz katru asins paraugu.
4. Iepildiet „CHANG Medium MF” pareizi marķētos, sterilos centrifūgas stobriņos ar aizskrūvētu vāciņu un aseptiski pievienojiet 0,1 ml sagatavotu PHA.
5. Tieši pirms kultivēšanas pievienojiet 0,4 ml heparinizētu asiņu, izmantojot sterilu 1 ml pipeti. Lietojiet 0,3 ml asiņu zīdaiņiem un bērniem un 0,5 ml grūtniecēm.
6. Inkubējiet kultūras 37 °C temperatūrā 72 stundas. Zīdaiņu un bērnu paraugiem inkubējiet vienu no divām kultūrām 37 °C temperatūrā 48 stundas. Grūtnieču paraugiem inkubējiet vienu no divām kultūrām 37 °C temperatūrā 96 stundas. Katru dienu samaisiet visus stobriņus, apvēršot otrādi.
7. Katrai kultūrai 16–18 stundas pirms timidīna pievienošanas pievienojiet 0,05 ml (50 µl)/5 ml metotreksāta darba šķīduma.
8. Katrai kultūrai pēc metotreksāta sinhronizācijas pabeigšanas (5–6 stundas pirms ievākšanas) pievienojiet 0,1 ml (100 µl)/5 ml timidīna darba šķīduma.

### B. Kultivētā materiāla ievākšana

1. Pirms ievākšanas uzsildiet hipotonisko šķīdumu (75 mM kālija hlorīdu) 37 °C ūdens vannā.
2. Katrai kultūrai pievienojiet 0,5 µl „Colcemid” šķīduma.
3. Uzmanīgi samaisiet kultūras un ievietojiet atpakaļ 37 °C inkubatorā.
4. Pēc 30 minūtēm izņemiet kultūras no inkubatora.
5. Centrifugējiet kultūras laboratorijas galdā centrifūgā ar 1000 apgr./min 10 minūtes.
6. Atdaliet lielāko daļu supernatanta šķidrums un likvidējiet to.
7. Atkārtoti suspendējiet lodīti 6–8 ml 75 mM kālija hlorīda šķīduma, kas iepriekš 10 minūtes sildīts līdz 37 °C.
8. Centrifugējiet, kā norādīts 5. darbībā, un likvidējiet supernatantu.
9. Izmantojot Pastēra pipeti, lēnām pievienojiet 6–8 ml tikko sagatavota, modificēta „Carnoy” fiksācijas šķīduma (3 daļas absolūtā metilspirta: 1 daļa ledus etiķskābes) lodītei, pastāvīgi maisot virpuļmaistītājā. Pievienojiet fiksācijas šķīdumu – sākumā pa pilienam, tad – ar smalku strūkuliņu, lai mazinātu šūnu bojājumus un kunčuļu veidošanos.
10. Atstājiet istabas temperatūrā 10 minūtes.
11. Centrifugējiet, kā norādīts 5. darbībā, tāpat kā iepriekš atdaliet supernatanta šķīdumu un lēni pievienojiet papildus 5 ml fiksācijas šķīduma, lai atkārtoti suspendētu lodīti.
12. Atkārtojiet 11. darbību vēl divas reizes, visbeidzot atkārtoti suspendējiet 0,5 ml fiksācijas šķīdumā. Izmantojiet šo šūnu suspensiju, lai sagatavotu priekšmetstikliņus testēšanai. Uzmanieties, lai nepieļautu šūnu sajaukšanos.

### C. Priekšmetstikliņu sagatavošana

1. Priekšmetstikliņiem jābūt pilnībā tīriem. Piemērota tīrīšanas procedūra: priekšmetstikliņi visu nakti jāmērcē hromskābē, pēc tam vismaz pusstundu jāskalo tekošā ūdenī un jānospodrina ar stiklam paredzētu lupatīņu.
2. No 8–10 cm (3–4 collu) augstuma virs priekšmetstikliņa virsas uzpiliņiet 1 vai 2 pilienu atkārtoti suspendētā šūnu preparāta priekšmetstikliņa vidū un ļaujiet tam izplēsties.
3. Noslaukiet lieko fiksācijas šķīdumu no priekšmetstikliņa malām, izmantojot filtrpapīru.
4. Tikko parādās Ūtona gredzeni, uzmanīgi papūtiēt preparātu, lai paātrinātu priekšmetstikliņa nožūšanu.
5. Iekrāsojiet ar Gjemza krāsvielu un nostipriniet paraugu uz priekšmetstikliņa.

## **KLĪNISKĀ IZMANTOŠANA**

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

## **GLABĀŠANA UN STABILITĀTE**

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

## **PIESARDZĪBAS PASĀKUMI UN BRĪDINĀJUMI**

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

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



## INDICATIE VOOR GEBRUIK

CHANG Medium MF is bedoeld voor gebruik bij de kweek van perifeer bloed en andere monsters voor cytogenetische analyse.

## BESCHRIJVING VAN HET HULPMIDDEL

CHANG Medium MF is een mitogeenvrij, kant-en-klaar medium bestaande uit RPMI met 20% FBS, 2 mM glutamine, 20 mM HEPES buffer en het antibioticum gentamicine (35 µg/ml). Het kan nodig zijn om aan CHANG Medium MF mitogenen toe te voegen, zoals fytohemagglutinine (PHA), om de groei van perifeer bloed en andere cellen te optimaliseren. De vereiste concentratie PHA (of andere mitogenen) dient door het afzonderlijke laboratorium te worden bepaald.

## COMPONENTEN

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

## KWALITEITSBORGING

### STERILITEIT

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

Diverse factoren, waaronder de bron van de monsters, kweekomstandigheden en de selectie van reagentia, kunnen van invloed zijn op het verkregen resultaat. Gebruikers wordt aangeraden elke nieuwe reagensbatch parallel met het referentiemateriaal met bekende geschikte activiteit te gebruiken voordat het routinematig wordt gebruikt.

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

## VEREISTE MAAR NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN EN APPARATUUR

1. Fytohemagglutinine (PHA)-oplossing (9 mg/ml), steriel
2. Fenolvrije heparine
3. Colcemide-oplossing, 25 µg/ml
4. Kaliumchlorideoplossing, 75 mM
5. Zuuralcohol, 1 deel ijsazijnzuur: 3 delen methanol (analytische reagentkwaliteit)
6. Giemsa of 2% azijnzuur-orceïne
7. Chromozoomzuur
8. Insluitmiddel
9. Objectglasjes en dekglasjes
10. Kunststof centrifugeerbuisjes
11. CO<sub>2</sub>-incubator
12. Tafelcentrifuge
13. Vortexmenger
14. Lichtmicroscop

## VERZAMELEN EN PREPAREREN VAN MONSTERS

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

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

## VOORBEREIDING OP HET GEBRUIK

Laat CHANG Medium MF een nacht in de koelkast (bij 2-8 °C) ontdoeien 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 MF. Uit onderzoek is gebleken dat de aanwezigheid van deze kristallen geen nadelige invloed heeft op de prestaties van het product.

## GEBRUIKSAANWIJZING

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

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

### A. Prepareren van (vol)bloedmicroculturen

1. Neem 5-20 ml vers bloed af in fenolvrije heparine en meng dit door middel van inversie.
2. Reconstitueer PHA door met een steriele injectiespuit 5 ml steriel gedistilleerd water toe te voegen.
3. Prepareer op aseptische wijze het vereiste volume van CHANG Medium MF (het microcultuurmedium), met 5 ml voor elk van de twee centrifugeerbuisjes per bloedmonster.
4. Breng CHANG Medium MF over naar gelabelde steriele centrifugeerbuisjes met schroefop en voeg op aseptische wijze 0,1 ml gereconstitueerd PHA toe.
5. Voeg net voordat u het op kweek zet met een steriele 1ml-pipet 0,4 ml gehepariniseerd bloed toe. Gebruik 0,3 ml voor baby's en kinderen en 0,5 ml voor zwangere vrouwen.
6. Incubeer de kweken gedurende 72 uur bij 37 °C. Incubeer voor monsters van baby's en kinderen een van de twee kweken gedurende 48 uur bij 37 °C. Voor monsters van zwangere vrouwen incubeer u een van de twee kweken gedurende 96 uur bij 37 °C. Meng elk buisje dagelijks door middel van inversie.
7. Voeg 16-18 uur vóór de toevoeging van thymidine aan elke kweek 0,05 ml (50 µl)/5 ml werkoplossing van methotrexaat toe.
8. Voeg na het voltooiën van methotrexaatsynchronisatie (5-6 uur vóór de oogst) aan elke kweek 0,1 ml (100 µl)/5 ml werkoplossing van thymidine toe.

### B. Oogsten van de kweken

1. Verwarm de hypotone oplossing (75 mM kaliumchloride) voor in een waterbad van 37 °C voordat u met oogsten begint.
2. Voeg 0,5 µl colcemide-oplossing aan elke kweek toe.
3. Meng voorzichtig en plaats de kweken terug in de incubator bij 37 °C.
4. Haal de kweken na 30 minuten uit de incubator.
5. Centrifugeer de kweken gedurende 10 minuten in een tafelcentrifuge op 1000 omw/min.
6. Verwijder het meeste supernatant en voer dit af.
7. Resuspender de pellet in 6-8 ml van de 75 mM kaliumchloride-oplossing, die gedurende 10 minuten tot 37 °C is voorverwarmd.
8. Centrifugeer zoals beschreven in stap 5 en voer het supernatant af.
9. Voeg met behulp van een pasteurpipet langzaam 6-8 ml vers geprepareerde gemodificeerde Carnoy's fixeeroplossing (3 delen absolute methanol: 1 deel ijsazijnzuur) aan de pellet toe, onder continu mengen met een vortexmenger. Voeg de fixeeroplossing eerst druppelsgewijs toe en vervolgens met een langzaam straalpje om celbeschadiging en klontvorming tot een minimum te beperken.
10. Laat 10 minuten op kamertemperatuur staan.
11. Centrifugeer zoals beschreven in stap 5, verwijder het supernatant zoals hierboven en resuspender de pellet door langzaam nog eens 5 ml fixeeroplossing toe te voegen.
12. Herhaal stap 11 nog twee keer en resuspender ten slotte in 0,5 ml fixeeroplossing. Gebruik deze celsuspensie om objectglasjes te prepareren voor onderzoek. Ga voorzichtig te werk om agitatie van de cellen te voorkomen.

### C. Prepareren van objectglasjes

1. Objectglasjes moeten kraakschoon zijn. Een geschikte manier van reinigen is om de objectglasjes een nacht ondergedompeld in chroomzuur te laten staan. Was de objectglasjes daarna gedurende ten minste een half uur onder stromend water af en poets ze schoon met een glazendoek.
2. Laat vanaf een hoogte van 8-10 cm (3-4 inch) één of twee druppels van het geresuspendeerde celpreparaat op het midden van een objectglasje vallen en wacht tot het zich verspreidt.



3. Veeg overtollige fixeeroplossing met filterpapier van de rand van het objectglaasje.
4. Blaas voorzichtig zodra er Newtonringen ontstaan om het drogen van het objectglaasje te versnellen.
5. Kleur met Giemsa en bevestig.

#### **KLINISCHE TOEPASSINGEN**

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

#### **BEWAREN EN STABILITEIT**

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

#### **VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN**

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

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



**PRZEZNACZENIE**

Pożywka CHANG Medium MF jest przeznaczona do użytku do hodowli próbek krwi obwodowej i innych próbek do analiz cytogenetycznych.

**OPIS WYROBU**

Produkt CHANG Medium MF to żywność wolna od mitogenów, gotowa do użycia, w której skład wchodzi żywność RPMI z 20-procentowym FBS, glutamina w stężeniu 2 mM, bufor HEPES w stężeniu 20 mM i antybiotyki, siarczan gentaminy (35 µg/ml). W celu zoptymalizowania wzrostu komórek krwi obwodowej i innych komórek może być konieczne dodanie do żywności CHANG Medium MF czynników mitogennych, takich jak fitohemaglutyna (PHA). Wymagane stężenie PHA (lub innych mitogenów) musi zostać określone przez dane laboratorium.

**SKŁADNIKI**

<u>Aminokwasy</u>	<u>Woda</u>	<u>Sole i jony</u>
Arginina	Woda o jakości WFI	Chlorek sodu
Asparagina	<u>Białka, hormony i czynniki wzrostu</u>	Chlorek choliny
Kwas asparaginowy	Plodowa surowica bydłęca (FBS)	Azotan wapnia
Cystyna	<u>Wskaźnik pH</u>	Chlorek potasu
Kwas glutaminowy	Czerwień fenolowa	Siarczan magnezu
Glutamina	<u>Inne</u>	Fosforan sodu
Glicyna	Biotyna	<u>Antybiotyki</u>
Histydyna	Hydroksyprolina	Siarczan gentaminy
Izoleucyna	Glutation	<u>Witaminy i pierwiastki śladowe</u>
Leucyna	<u>Bufory</u>	Kwas foliowy
Lizyna	Wodorowęglan sodu	Nikotynamid
Metionina	HEPES	Ryboflawina
Fenylalanina	<u>Substraty energetyczne</u>	Tiamina
Prolina	Glukoza	Kwas pantotenowy
Seryna	Inozytol	Kobalamina
Treonina		Pirydoksyna
Tryptofan		Kwas aminobenzoowy
Tyrozyna		
Walina		

**ZAPEWNIANIE JAKOŚCI**

**STERYLNOŚĆ**

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

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

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

**MATERIAŁY I WYPOSAŻENIE WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE**

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

12. Wirówka laboratoryjna
13. Wytrząsarka
14. Mikroskop świetlny

#### **POBRANIE PRÓBEK I POSTĘPOWANIE Z NIMI**

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

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

#### **PRZYGOTOWANIE DO UŻYCIA**

Pożywkę CHANG Medium MF 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 niezłobocznego użycia do hodowli szpiku kostnego.

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

#### **INSTRUKCJA UŻYCIA**

Do badań cytogenetycznych wykorzystano krew pełną lub oddzielone leukocyty, ale postępowanie z krwią jest łatwiejsze i jest ona najczęściej stosowana w rutynowych badaniach. Podobnie jak w przypadku każdej procedury hodowli komórkowej, optymalne wyniki są uzależnione od zapewnienia odpowiednich warunków hodowli. Jako że względna ilość aktywnej PHA może nieznacznie różnić się między seriami, przetestowanie dwóch stężeń PHA może być korzystne.

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

#### **A. Przygotowanie mikrohodowli krwi pełnej**

1. Zebrać 5–20 ml świeżej krwi do heparyny wolnej od fenoli i wymieszać, odwracając.
2. Zrekonstruować PHA, dodając 5 ml sterylnej wody destylowanej za pomocą sterylnej strzykawki.
3. Stosując technikę aseptyczną, przygotować wymaganą objętość pożywki CHANG Medium MF (pożywka do mikrohodowli), przeznaczając 5 ml na każdą z dwóch próbek wirówkowych na próbkę krwi.
4. Rozdzielić pożywkę CHANG Medium MF do odpowiednio oznaczonych sterylnych próbek wirówkowych z nakrętkami i aseptycznie dodać 0,1 ml zrekonstruowanej PHA.
5. Tuż przed posiewem komórek dodać 0,4 ml heparynizowanej krwi za pomocą sterylnej pipety o poj. 1 ml. Użyć 0,3 ml krwi w przypadku niemowląt i dzieci oraz 0,5 ml w przypadku kobiet w ciąży.
6. Inkubować hodowlę w temperaturze 37°C przez 72 godziny. W przypadku niemowląt i dzieci inkubować jedną z dwóch hodowli w temperaturze 37°C przez 48 godzin. W przypadku kobiet w ciąży inkubować jedną z dwóch hodowli w temperaturze 37°C przez 96 godzin. Codziennie mieszać zawartość każdej próbki, odwracając ją.
7. Dodać 0,05 ml (50 µl) 5 ml roztworu roboczego metotreksatu do każdej hodowli na 16–18 godzin przed dodaniem tymidyny.
8. Dodać 0,1 ml (100 µl) 5 ml roztworu roboczego tymidyny do każdej hodowli po zakończeniu synchronizacji za pomocą metotreksatu (5–6 godzin przed zbiorem).

#### **B. Zbiór hodowli**

1. Przed zbiorem wstępnie ogrzać roztwór hipotoniczny (chlorek potasu w stężeniu 75 mM) w łaźni wodnej nastawionej na temperaturę 37°C.
2. Dodać po 0,5 µl roztworu kolcemu do każdej hodowli.
3. Delikatnie wymieszać i ponownie umieścić w inkubatorze nastawionym na temperaturę 37°C.
4. Po 30 minutach wyciągnąć hodowlę z inkubatora.
5. Wirować hodowlę w wirówce laboratoryjnej przy 1000 rpm przez 10 minut.
6. Usunąć większość nadsąca i odrzucić go.
7. Zawiesić osad w 6–8 ml roztworu chlorku potasu o stężeniu 75 mM wstępnie ogrzewanego do temperatury 37°C przez 10 minut.
8. Odwirować, tak jak w kroku 5, i odrzucić nadsąc.
9. Używając pipety Pasteura powoli dodać 6–8 ml świeżo przygotowanego zmodyfikowanego roztworu utwalającego Carnoy'a (3 części metanolu absolutnego: 1 część lodowatego kwasu octowego) do osadu, wytrząsając go w sposób ciągły na wytrząsarce. Początkowo dodawać roztwór utwalający kroplami, a następnie powolnym strumieniem, aby zminimalizować uszkodzenia komórek i tworzenie grudek.
10. Pozostawić w temperaturze pokojowej na 10 minut.
11. Odwirować, tak jak w kroku 5, i odrzucić nadsąc, a następnie powoli dodać dodatkowe 5 ml roztworu utwalającego, aby zawiesić osad.
12. Powtórzyć krok 11 jeszcze dwa razy, zawieszając ostatecznie osad w 0,5 ml roztworu utwalającego. Użyć tej zawiesiny komórkowej do przygotowania szkiełek do badania. Należy zachować ostrożność, aby nie wstrząsać komórkami.

### **C. Przygotowanie szkiełek**

1. Szkiełka muszą być dokładnie oczyszczone. Odpowiednia procedura oczyszczania polega na moczeniu szkiełek przez noc w kwasie chromowym, a następnie płukaniu pod bieżącą wodą przez co najmniej pół godziny i wypolerowaniu szmatką do szkła.
2. Nalażyć od 1 do 2 kropli preparatu zawieszonych komórek na środek szkiełka z wysokości 8–10 cm (3–4 cali) od górnej części szkiełka i pozostawić do rozplynięcia.
3. Zeźrzeć bibułą filtracyjną nadmiar roztworu utrwalającego z brzegów szkiełka.
4. Po pojawieniu się okręgów Newtona delikatnie podmuchać, aby przyspieszyć ostateczne suszenie szkiełka.
5. Wybawić barwnikiem Giemsy i osadzić szkiełko nakrywkowe.

### **ZASTOSOWANIA KLINICZNE**

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

### **PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ**

Pożywkę CHANG Medium MF należy przechowywać zamrożoną w temperaturze poniżej  $-10^{\circ}\text{C}$  do czasu użycia. Pożywka Chang Medium MF zachowuje stabilność do upływu terminu ważności podanego na etykiecie butelki, jeśli jest przechowywana w stanie zamrożonym. Po rozmrożeniu nieużyty produkt można rozdzielić na porcje robocze i zamrozić ponownie (maksymalnie dwa razy) do późniejszego użytku lub szczelnie zamknąć i przechowywać w temperaturze od  $2^{\circ}\text{C}$  do  $8^{\circ}\text{C}$  do 30 dni. Chronić przed światłem fluorescencyjnym.

### **ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA**

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

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



## INDICAȚIE DE UTILIZARE

CHANG Medium MF este destinat utilizării pentru cultivarea sângelui periferic și altor probe în scop de analiză citogenetică.

## DESCRIEREA DISPOZITIVULUI

CHANG Medium MF este un mediu fără mitogen, gata de utilizare, care constă în RPMI conținând 20% FBS, 2 mM glutamină, 20 mM tampon HEPES și antibioticul sulfat de gentamicină (35 μg/ml). CHANG Medium MF poate necesita adăugarea de agenți mitogenici, cum ar fi fitohemaglutinina (PHA) pentru a optimiza creșterea celulelor din sângele periferic și a altor celule. Concentrația necesară de PHA (sau alți mitogeni) ar trebui stabilită de laboratorul dumneavoastră.

## COMPONENTE

### Aminoacid

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

### Apă

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

### Proteine, hormoni și factori de creștere

Ser fetal bovin (SFB)

### Indicator pH

Roșu de fenol

### Altul

Biotină  
Hidroxiprolină  
Glutation  
Soluții tampon  
Bicarbonat de sodiu  
HEPES  
Substraturi energetice  
Glucoză  
Inozitol

### Săruri și ioni

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

### Antibiotic

Sulfat de gentamicină

### Vitamine și oligoelemente

Acid folic  
Nicotinamidă  
Riboflavină  
Tiamină  
Acid pantotenic  
Cobalamină  
Piridoxină  
Acid aminobenzoic

## ASIGURAREA CALITĂȚII

### STERILITATE

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

Mai mulți factori, printre care se numără sursa de probe, condițiile de cultivare și selecția reactivilor, pot influența rezultatul obținut. Înainte de adoptarea pentru utilizarea de rutină, utilizatorii sunt sfătuiți să ruleze fiecare lot de reactiv în paralel cu materialul de referință despre care se cunoaște că acționează adecvat.

Fiecare lot de CHANG Medium MF este evaluat folosind sângele periferic pentru indicele mitotic, lungimea cromozomilor și calitatea în comparație cu un mediu de control. Rezultatele sunt raportate într-un certificat de analiză specific pentru fiecare lot.

## MATERIALE ȘI APARATURĂ NECESARE, DAR NEFURNIZATE

- Soluție de fitohemaglutinină (PHA) (9 mg/ml), sterilă
- Heparină fără fenol
- Colcemid soluție 25 μg/ml
- Soluție de clorură de potasiu, 75 mM
- Acid acetic, 1 parte acid acetic glacial : 3 părți metanol (calitate de reactiv analitic)
- Giemsa sau acid acetic-orceină 2%
- Acid cromic
- Mediu de montare
- Lame și lamele de sticlă
- Eprubete de centrifugă din plastic
- Incubator cu CO<sub>2</sub>
- Centrifugă de masă
- Agitator vortex
- Microscop optic

## COLECTAREA ȘI MANIPULAREA PROBELOR

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

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

## PREGĂTIREA PENTRU UTILIZARE

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

## INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

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

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

### A. Pregătirea microculturilor de sânge integral

1. Recoltați 5-20 ml de sânge proaspăt pe heparină fără fenol și agitați prin răsturnare.
2. Reconstituiți PHA prin adăugarea a 5 ml de apă distilată sterilă folosind o seringă sterilă.
3. Folosind tehnici aseptice, pregătiți volumul necesar de CHANG Medium MF (mediu de microcultură) repartizând 5 ml pentru fiecare dintre cele două eprubete de centrifugă per probă de sânge.
4. Transferați CHANG Medium MF în eprubete de centrifugă cu filet sterilizate și etichetate adecvat și adăugați aseptice 0,1 ml PHA reconstituit.
5. Imediat înainte de cultivare, adăugați 0,4 ml de sânge heparinizat folosind o pipetă sterilă de 1 ml. Folosiți 0,3 ml de sânge pentru nou-născuți și copii și 0,5 ml pentru femeile gravide.
6. Incubați culturile la 37°C timp de 72 de ore. Pentru probele de la nou-născuți și copii, incubați una dintre cele două culturi la 37°C timp de 48 de ore. Pentru femeile gravide, una dintre cele două culturi poate fi incubată la 37°C timp de 96 de ore. Amestecați zilnic fiecare eprubetă prin răsturnare.
7. Adăugați 0,05 ml (50 μl)/5 ml de soluție de lucru de metotrexat la fiecare cultură cu 16-18 ore înainte de adăugarea timidinei.
8. Adăugați 0,1 ml (100 μl)/5 ml de soluție de lucru de timidină la fiecare cultură după încheierea sincronizării cu metotrexat (5-6 ore înainte de recoltare).

### B. Recoltarea culturilor

1. Preîncălziți soluția hipotonică (clorură de potasiu 75 mM) într-o baie de apă la 37°C înainte de recoltare.
2. Adăugați la fiecare cultură 0,5 μl de soluție de Colcemid.
3. Amestecați ușor și puneți la loc în incubator la 37°C.
4. Scoateți culturile din incubator după 30 de minute.
5. Centrifugați culturile într-o centrifugă de masă la 1.000 rpm timp de 10 minute.
6. Îndepărtați majoritatea fluidului supernatant și eliminați-l.
7. Resuspendați peleta în 6 până la 8 ml soluție de clorură de potasiu 75 mM preîncălzită la 37°C timp de 10 minute.
8. Centrifugați ca la pasul 5 și eliminați supernatantul.
9. Folosind o pipetă Pasteur, adăugați lent între 6 și 8 ml de soluție de fixare Carnoy proaspăt preparată (3 părți metanol absolut : 1 parte acid acetic glacial) la peletă sub agitare constantă la un agitator vortex. Adăugați soluția de fixare la început în picături, apoi prin prelungere lentă pentru a minimiza vătămarea celulelor și formarea de cocoloașe.
10. Lăsați 10 minute la temperatura camerei.
11. Centrifugați ca la pasul 5 și îndepărtați fluidul supernatant ca mai sus și adăugați lent încă 5 ml de soluție de fixare pentru a resuspenda peleta.
12. Repetați încă de două ori pasul 11, resuspendând în final în 0,5 ml soluție de fixare. Folosiți această suspensie de celule pentru a pregăti lamele pentru examinare. Trebuie să se manifeste atenție pentru a evita agitarea celulelor.

### C. Pregătirea lamelor

1. Lamele trebuie să fie extrem de curate. O procedură de curățare corespunzătoare o reprezintă lăsarea la înmuiat peste noapte a lamelor în acid cromic, după care acestea trebuie spălate sub jet de apă timp de cel puțin o jumătate de oră și lustruite cu o lavetă pentru sticlă.
2. Aplicați 1 sau 2 picături din preparatul de celule resuspendate în centrul lamei de sticlă de la o înălțime de 8-10 cm (3-4 inci) deasupra lamei și lăsați să se distribuie.
3. Ștergeți excesul de soluție de fixare de pe marginile lamei cu hârtie de filtru.
4. La prima apariție a inelelor lui Newton, suflați încet pentru a grăbi uscarea finală a lamei.
5. Colorați cu Giemsa și montați.



## **ÎNTEBUIŢĂRI CLINICE**

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

## **DEPOZITARE ȘI STABILITATE**

Depozitați CHANG Medium MF congelat, la mai puțin de -10°C, până când este gata pentru utilizare. CHANG Medium MF este stabil până la data de expirare indicată pe eticheta de pe flacon când este depozitat congelat. După dezghețare, orice produs neutilizat poate fi transferat în părți alicote de lucru și recongelat (de maximum două ori) pentru utilizare ulterioară sau închis ermetic și depozitat la o temperatură de 2°C-8°C timp de până la 30 de zile. Protejați de lumina fluorescentă.

## **PRECAUȚII ȘI AVERTISMENTE**

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

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



## INDIKATIONER

CHANG Medium MF är avsett för användning vid odling av perifert blod och andra provtyper för cytogenetiska analyser.

## PRODUKTBESKRIVNING

CHANG Medium MF är ett medium utan mitogener, som är färdigt att användas och består av RPMI med 20 % FBS, 2 mM glutamin, 20 mM HEPES-buffert samt gentamicinsulfat (35 µg/ml). CHANG Medium MF kan behöva kompletteras med mitogener, som t.ex. fytohemagglutinin (PHA), för att optimera växten av celler i perifert blod och andra celler. Koncentrationen PHA (eller annan mitogen) som krävs bör fastställas av det enskilda laboratoriet.

## KOMPONENTER

<u>Aminosyror</u>	<u>Vatten</u>	<u>Salter och joner</u>
Arginin	Vatten för injektion (WFI)	Natriumklorid
Asparagin	<u>Proteiner, hormoner samt tillväxtfaktorer</u>	Kolinklorid
Asparaginsyra	Fetalt bovint serum (FBS)	Kalciumnitrat
Cystin		Kaliumklorid
Glutaminsyra	<u>pH-indikator</u>	Magnesiumsulfat
Glutamin	Fenolrött	Natriumfosfat
Glycin	<u>Övrigt</u>	<u>Antibiotikum</u>
Histidin	Biotin	Gentamicinsulfat
Isoleucin	Hydroxiprolin	<u>Vitaminer och spårämnen</u>
Leucin	Glutation	Folsyra
Lysin	<u>Buffertar</u>	Nikotinamid
Metionin	Natriumbikarbonat	Riboflavin
Fenylalanin	HEPES	Tiamin
Prolin	<u>Energisubstrat</u>	Pantotensyra
Serin	Glukos	Kobalamin
Treonin	Inositol	Pyridoxin
Tryptofan		Aminbensoesyra
Tyrosin		
Valin		

## KVALITETSSÄKRING

### STERILITET

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

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

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

## MATERIAL OCH UTRUSTNING SOM KRÄVS MEN INTE MEDFÖLJER

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

## PROVTAGNING OCH -HANTERING

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

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

## BEREDNING FÖR ANVÄNDNING

CHANG Medium MF 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 ekvibrera till 37 °C för omedelbar användning till benmärgsodling.

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

## BRUKSANVISNING

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

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

### A. Beredning av mikroodlingar av helblod

1. Ta 5–20 ml färskt blod i fenolfritt heparin och blanda genom vändning.
2. Rekonstituera PHA genom att tillsätta 5 ml sterilt destillerat vatten med hjälp av en steril spruta.
3. Bered med aseptisk teknik nödvändig volym CHANG Medium MF (mikroodlingsmedium), 5 ml för vart och ett av två centrifugrör per blodprov.
4. Dispensera CHANG Medium MF i sterila centrifugrör med skruvlock, märkta på lämpligt sätt, och tillsätt aseptiskt 0,1 ml rekonstituerad PHA.
5. Tillsätt 0,4 ml hepariniserat blod omedelbart före odling, med hjälp av en steril 1 ml pipett. Använd 0,3 ml blod för spädbarn och barn och 0,5 ml för gravida kvinnor.
6. Inkubera odlingarna vid 37 °C i 72 timmar. För prover från spädbarn och barn ska en av de två odlingarna inkuberas vid 37 °C i 48 timmar. För gravida kvinnor kan en av de två odlingarna inkuberas vid 37 °C i 96 timmar. Blanda dagligen varje rör genom vändning.
7. Tillsätt 0,05 ml (50 µl)/5 ml av en arbetslösning av metotrexat till varje kultur 16–18 timmar före tillsättning av tymidin.
8. Tillsätt 0,1 ml (100 µl)/5 ml av en arbetslösning av tymidin till varje kultur efter avslutad metotrexatsynkronisering (5–6 timmar före skörd).

### B. Skörda kulturerna

1. Förvärm den hypotona lösningen (75 mM kaliumklorid) i 37 °C vattenbad före skörd.
2. Tillsätt 0,5 µl av en Colcemid-lösning till varje kultur.
3. Blanda försiktigt och sätt tillbaka kulturerna i 37 °C-inkubatorn.
4. Ta ut kulturerna ur inkubatorn efter 30 minuter.
5. Centrifugera igen som i steg 5 och kassera supernatanten.
6. Avlägsna det mesta av supernatanten och kassera den.
7. Resuspendera pelleten i 6–8 ml 75 mM kaliumkloridlösning förvärm till 37 °C i 10 minuter.
8. Centrifugera igen som i steg 5 och kassera supernatanten.
9. Använd en Pasteur-pipett till att långsamt tillsätta 6–8 ml färsk Carnoys fixeringslösning (3 delar absolut metanol:1 del vattenfri ättiksyra) till pelleten under konstant skakning på en vortexblandare. Tillsätt fixeringslösningen först droppvis och därefter i en mycket svag stråle så att cellskador och bildning av klumpar minimeras.
10. Låt stå i rumstemperatur i 10 minuter.
11. Centrifugera som i steg 5, avlägsna supernatanten som tidigare och tillsätt långsamt ytterligare 5 ml fixeringslösning för att resuspendera pelleten.
12. Upprepa steg 11 två gånger till och resuspendera slutligen i 0,5 ml fixeringslösning. Använd denna cellsuspension till att preparera objektglas för undersökning. Undvik noga att skaka cellerna.

### C. Preparering av objektglas

1. Objektglasen måste vara fullkomligt rena. En lämplig rengöringsmetod är att blötlägga objektglasen i kromsyra över natten och därefter tvätta dem under rinnande vatten i minst en halvtimme och sedan polera dem med en duk avsedd för glas.
2. Påför 1 eller 2 droppar av det resuspenderade cellpreparatet till mitten av ett objektglas från en höjd på 8–10 cm (3–4 tum) ovanför objektglaset och låt dem spridas ut.
3. Torka av överflödig fixeringslösning från objektglaset kanter med hjälp av filterpapper.
4. Blås försiktigt för att påskynda torkningen av objektglaset så snart Newtonringar uppträder.
5. Färga med Giemsa och montera.

## **KLINISKA TILLÄMPNINGAR**

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

## **FÖRVARING OCH HÅLLBARHET**

CHANG Medium MF ska förvaras fryst, vid temperatur under  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tills det ska användas. Vid frysförvaring är CHANG Medium MF hållbart fram till det utgångsdatum som anges på flaskans etikett. Efter upptining kan eventuell oanvänd produkt delas upp i alikvoter och frysas på nytt (högst två gånger) för senare användning, eller förslutas tätt och förvaras vid  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  i upp till 30 dagar. Skyddas mot fluorescerande ljus.

## **FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR**

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

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



## NÄIDUSTUS KASUTAMISEKS

CHANG Medium MF on mõeldud perifeerse vere ja muude proovide kultuurimiseks tsütogeneetilise analüüsi eesmärgil.

## SEADME KIRJELDUS

CHANG Medium MF mitogeenivaba kasutusvalmis sööde, mis koosneb RPMI-st, mis sisaldab 20% FBS-i, 2 mM glutamiini, 20 mM HEPES-puhvrit ja antibiootikumi gentamitsiinsulfaat (35 µg/ml). CHANG Medium MF võib vajada mitogeensete ainete lisamist, nt fütohemaglutiniini (PHA), et optimeerida perifeersete vere- ja muude rakkude kasvu. PHA (või muude mitogeenide) nõutava kontsentratsiooni peab määrama iga labor eraldi.

## OSAD

<u>Aminohape</u>	<u>Vesi</u>	<u>Soolad ja ioonid</u>
Arginiin	WFI kvaliteet	Naatriumkloriid
Asparagiin	<u>Valgud, hormoonid ja kasvufaktorid</u>	Koliinkloriid
Asparagiinhape	Veiselote päritolu seerum (FBS)	Kaltsiumnitraat
Tsüstiin	<u>pH-indikaator</u>	Kaaliumkloriid
Glutamiinhape	Fenoolpunane	Magneesiumsulfaat
Glutamiin	<u>Muu</u>	Naatriumfosfaat
Glütsiin	Biotiin	<u>Antibiootikum</u>
Histiidiin	Hüdroksüproliin	Gentamitsiinsulfaat
Isoleutsiin	Glutatioon	<u>Vitamiinid ja mikroelemendid</u>
Leutsiin	<u>Puhvrid</u>	Foolhape
Lüsiin	Naatriumvesinik-karbonaat	Nikotiinamiid
Metioniin	HEPES	Riboflaviin
Fenüülalaniin	<u>Energia substraadid</u>	Tiamiin
Proliin	Glükoos	Pantoteenhape
Seriin	Inositool	Kobalamiin
Treoniin		Püridoksiin
Trüptofaan		Aminobensoehape
Türosiin		
Valiin		

## KVALITEEDI TAGAMINE

### STERIILSUS

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

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

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

## VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID JA VAHENDID

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

## PROOVI VÕTMINE JA KÄITLEMINE

Täisvere kultuuride edukust tsütogeneetilisel analüüsimisel mõjutab tavapäraselt funktsioneerivate lümfotsüütide tase proovi võtmise ajal. Kuna seda taset võivad mõjutada infektsioonid ja ravimid, siis ei tohi võimaluse korra tsütogeneetilistes uuringutes osalejad võtta ravimeid 7 päeva enne vereproovide võtmist. Teatud haiguste (nt Hodgkini tõve, sarkoidoosi jne) anergiline faas võib tugevalt mõjutada ka mitootilist indeksit ning vähemal määral ka terveid inimesi raseduse hilisemates faasides. Vereproovidele ei tohi lümfotsüüdkultuuride korral lisada säilitusainet. Vajalik on aseptiline tehnika.

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

## ETTEVALMISTUSED KASUTAMISEKS

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

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

## KASUTUSJUHEND

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

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

### A. Täisvere mikrokooskultuuride ettevalmistamine

1. Koguge 5–20 ml värsket verd fenoolivabasse hepariini ja segage katsuit keerates.
2. Muutke PHA manustamiskõblikuks, lisades steriilse süstlaga 5 ml steriilset destilleeritud vett.
3. Valmistage aseptilise tehnikaga ette vajalik kogus CHANG Medium MF-i (mikrokooskultuurimissööde), 5 ml igale kahele tsentrifuugikatsutile vereproovi kohta.
4. Jaotage CHANG Medium MF vastavalt sildistatud steriilsetesse keermestatud korgiga tsentrifuugikatsutitesse ja lisage aseptiliselt 0,1 ml manustamiskõblikuks muudetud PHA-d.
5. Vahetult enne kultuurimist lisage 0,4 ml hepariniseeritud verd, kasutades steriilset 1 ml pipetti. Kasutage 0,3 ml verd vastsündinute ja laste puhul ning 0,5 ml rasedate naiste puhul.
6. Inkubeerige kultuure temperatuuril 37 °C 72 tundi. Vastsündinute ja laste proovide puhul inkubeerige üht kahest kultuurist 37 °C 48 tundi. Rasedate naiste puhul võib üht kahest kultuurist inkubeerida 37 °C 96 tundi. Segage igat katsuit ringikeeramise teel iga päev.
7. Lisage 0,05 ml (50 µl)/5 ml metotreksaadi töөлahust igale kultuurile 16–18 tundi enne tümidiini lisamist.
8. Lisage 0,1 ml (100 µl)/5 ml tümidiini töөлahust igale kultuurile pärast metotreksaadiga sünkroniseerimist (5–6 tundi enne kogumist).

### B. Kultuuride kogumine

1. Enne kogumist soojendage hüpotoonilist lahust (75 mM kaaliumkloriidi) 37 °C veevannis.
2. Lisage igale kultuurile 0,5 µl Colcemidi.
3. Segage õrnalt ja viige tagasi 37 °C inkubaatorisse.
4. Eemaldage kultuurid inkubaatorist 30 minuti pärast.
5. Tsentrifuugige kultuure lauatsentrifuugis 1000 p/min 10 minutit.
6. Eemaldage suurem osa supernatantvedelikust ja visake ära.
7. Resuspendeerige pellet 6–8 ml 75 mM kaaliumkloriidi lahuses, mida on enne 10 minutit soojendatud 37 °C-ni.
8. Tsentrifuugige nagu 5. sammus ja visake supernatant ära.
9. Lisage pelletile Pasteuri pipetiga aeglaselt 6–8 ml värskelt valmistatud modifitseeritud Carnoy kinnitit (3 osa absoluutmetanooli: 1 osa jää-äädikhapet), samal ajal Vortex-seguriga pidevalt segades. Lisage kinnitit esmalt tilkhaaval, seejärel ühtlase joana, et minimeerida rakukahjustusi ja klompide teket.
10. Jätke 10 minutiks toatemperatuurile.
11. Tsentrifuugige nagu 5. sammus ja eemaldage supernatantvedelik nagu varemgi, lisage aeglaselt veel 5 ml kinnitit pelleti resuspendeerimiseks.
12. Korrake 11. sammu veel kaks korda, resuspendeerides lõpuks 0,5 ml kinnitit. Kasutage seda rakususpensiooni uuringuslaidide ettevalmistamiseks. Vältige hoolikalt rakkude agitatsiooni.

### C. Slaidide ettevalmistus

1. Slaidid peavad olema äärmiselt puhtad. Sobiv puhastusprotseduur on leotada slaide üleöö kroomhappes ja pesta seejärel voolava vee all vähemalt pool tundi ning hõõruda klaasipesulapiga.
2. Kandke klaasslaidi keskossa 1 või 2 tilka resuspendeeritud rakuvalmistist, tilgutades 8–10 cm (3–4 tolli) kõrguselt, ja laske laiali valguda.
3. Pühkige liigne kinnitit slaidi servadelt filterpaberiga maha.
4. Newtoni rõngaste tekkimisel puhuge õrnalt peale, et slaidi kuivamist kiirendada.
5. Värvige Giemsa-ga ja paigaldage katteklasa.



## **KLIINILISED RAKENDUSED**

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

## **SÄILITAMINE JA STABIILSUS**

Hoidke CHANG Medium MF-i kuni kasutamiseni külmutatult alla  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Chang Medium MF on juhistekohasel säilitamisel stabiilne pudeli etiketile märgitud kuupäevani. Pärast sulatamist võib kasutamata toote jagada tööalikuotidesse ja külmutada hilisemaks kasutamiseks uuesti (kuni kaks korda) või tihedalt korkida ja hoida temperatuuril  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  kuni 30 päeva. Kaitske fluorestantsvalguse eest.

## **ETTEVAATUSABINÕUD JA HOIATUSED**

See seade on ette nähtud kasutamiseks tervishoiutöötajatele, kes on saanud koolituse selle seadme sihtotstarbelise kasutamise alal. CHANG Medium MF sisaldab FBS-i ning seda tuleb käidelda tavapärase laboratoorse ettevaatusmeetmetega. Sööde sisaldab antibiootikumi (gentamitsiinsulfaati), et vähendada bakteriaalse saaste võimalust, kuid söötme jaotamisel tuleb alati rakendada aseptilist tehnikat. Ärge kasutage ühtki söödet, mis ei ole punast värvi.



**FELHASZNÁLÁSI JAVALLATOK**

A CHANG Medium MF perifériás vér és más minták tenyésztésére szolgál citogenetikai elemzés céljából.

**TERMÉKISMERTETÉS**

A CHANG Medium MF egy mitogénmentes, használatra kész médium, amely 20% FBS-t, 2 mM glutamint, 20 mM HEPES-puffert és gentamicin-szulfát antibiotikumot (35 µg/ml) tartalmazó RPMI médiumból áll. A CHANG Medium MF mitogén szerek, például fitohemagglutinin (PHA) hozzáadását igényelheti a perifériás vér és más sejtek növekedésének optimalizálásához. A PHA (vagy más mitogének) szükséges koncentrációját az adott laboratórium határozza meg.

**ÖSSZETEVŐK**

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

**MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS****STERILITÁS**

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

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

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

**SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK ÉS FELSZERELÉS**

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

## A MINTÁK GYŰJTÉSE ÉS KEZELÉSE

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

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

## ELŐKÉSZÍTÉS A FELHASZNÁLÁSRA

A CHANG Medium MF 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 sterili tenyésztőflaskákba, és ekvilibálja 37 °C-ra a csontvelőtenyészetekhez történő azonnali felhasználáshoz.

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

## HASZNÁLATI UTASÍTÁS

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

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

### A. A teljes vér mikrotenyészetek előkészítése

1. Tegyen 5–20 ml friss vért fenolmentes heparinba, és keverje össze a cső fel-le fordításával.
2. Oldja fel a PHA-t 5 ml steril desztillált víz steril fecskendővel történő hozzáadásával.
3. Aszeptikus technikával készítse elő a szükséges mennyiségű CHANG Medium MF médiumot (mikrotenyészet-médium), mindkét centrifugacsőhöz vérmintánként 5 ml-t adva.
4. Tegyen CHANG Medium MF médiumot a megfelelően feliratozott, steril, csavaros kupakkal ellátott centrifugacsövekbe, és aszeptikusan adjon hozzá 0,1 ml feloldott PHA-t.
5. Közvetlenül a tenyésztés előtt adjon hozzá 0,4 ml heparinált vért egy steril, 1 ml-es pipettával. Csecsemők és gyermekek esetén 0,3 ml, terhes nőknél 0,5 ml vért használjon.
6. Inkubálja a tenyészeteket 37 °C-on 72 órán át. Csecsemők és gyermekek mintái esetén a két tenyészet egyikét 37 °C-on 48 órán át inkubálja. Terhes nők esetén a két tenyészet egyikét 37 °C-on 96 órán át inkubálja. Minden csövet naponta keverjen össze a csövek fel-le fordításával.
7. Adjon 0,05 ml (50 µl)/5 ml metotrexát-munkaoldatot minden tenyészethez 16–18 órával a timidin hozzáadása előtt.
8. A metotrexát-szinkronizálás befejezése után (5–6 órával az összegyűjtés előtt) adjon minden tenyészethez 0,1 ml (100 µl)/5 ml timidin-oldatot.

### B. A tenyészetek összegyűjtése

1. Az összegyűjtés előtt melegítse elő a hipotóniás oldatot (75 mM kálium-klorid) 37 °C-os vízfürdőben.
2. Adjon mindegyik tenyészethez 0,5 µl kolcemidoldatot.
3. Óvatosan keverje össze, és tegye vissza a 37 °C-os inkubátorba.
4. 30 perc elteltével vegye ki a tenyészeteket az inkubátorból.
5. Centrifugálja a tenyészeteket egy asztali centrifugában 1000 rpm-mel 10 percig.
6. Távolítsa el a felülúszó folyadék nagy részét, és dobja ki.
7. Szuszpendálja fel újra a pelletet 6–8 ml 75 mM-os kálium-klorid oldatban, amelyet 10 perc át előmelegített 37 °C-ra.
8. Centrifugálja az 5. lépésben leírtak szerint, és dobja ki a felülúszót.
9. Pasteur-pipettával lassan adjon 6–8 ml frissen elkészített, módosított Carnoy-féle fixálószert (3 rész abszolút metanol : 1 rész jégecet) a pallethez, miközben folyamatosan keveri egy vortex keverőn. Először cseppenként, majd lassú csepegtetéssel adja hozzá a fixálószert a sejtkárosodás és a csomóképződés minimalizálása érdekében.
10. Hagyja szobahőmérsékleten 10 percig.
11. Centrifugálja az 5. lépésben leírtak szerint, távolítsa el a felülúszó folyadékot a korábban ismertetett módon, majd lassan adjon hozzá további 5 ml fixálószert a pellet újabb felszuszpendálásához.
12. Ismétlje meg a 11. lépést még kétszer, végül 0,5 ml fixálószertben felszuszpendálva. Ezt a sejtszuspenziót használja a vizsgálati metszetek elkészítéséhez. Óvatosan kell eljárni a sejtek keveredésének elkerülése érdekében.

### C. A tárgylemezek előkészítése

1. A tárgylemezeket alaposan meg kell tisztítani. Megfelelő tisztítási eljárás, hogy a tárgylemezeket egy éjszakán át áztassa krómsavban, majd legalább fél órán át mossa folyó vízben, és fényesítse üvegtrólió kendővel.
2. Cseppentsen 1 vagy 2 csepp újra felszuszpendált sejtpreparátumot egy üveg tárgylemez közepére 8–10 cm (3–4 hüvelyk) magasságból, és hagyja szétterjedni.
3. Törölje le a felesleges fixálószert a tárgylemez széleiről szűrőpapírral.
4. A Newton-gyűrűk első megjelenésekor óvatosan fújja a tárgylemezt a végső száradás felgyorsításához.
5. Fesse meg Giemsa-val, és fedje le.

## **KLINIKAI ALKALMAZÁSOK**

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

## **TÁROLÁS ÉS STABILITÁS**

A CHANG Medium MF médiumot fagyaszta,  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  alatt tárolja a felhasználásig. A CHANG Medium MF stabil az üveg címkéjén feltüntetett lejárati időpontig, amennyiben fagyaszta tárolják. A felolvasztást követően a fel nem használt termék munkaalkivotokra osztható, és későbbi használatra újra lefagyasztható (legfeljebb kétszer), vagy szorosan lezárva  $2\text{ és }8\text{ }^{\circ}\text{C}$  közötti hőmérsékleten, legfeljebb 30 napig tárolható. Védje a fluoreszcens fénytől.

## **ÓVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK**

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

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



**NAUDOJIMO INDIKACIJA**

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

**ĮTAISO APRAŠYMAS**

„CHANG Medium MF“ yra paruošta naudoti terpė be mitogenų, kurios sudėtyje yra RPMI terpės su 20 % FBS, 2 mM glutamino, 20 mM HEPES buferio ir antibiotiko gentamicino sulfato (35 µg/ml). Norint optimizuoti periferinio kraujo ar kitokių ląstelių augimą, „CHANG Medium MF“ terpę gali prireikti papildyti mitogeninėmis medžiagomis, pvz., fitohemaglutininu (PHA). Kiekviena laboratorija turi pati nusistatyti reikiamą PHA (ar kitų mitogenų) koncentraciją.

**SUDEDAMOSIOS DALYS**Aminorūgštis

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

Vanduo

Injekcinio vandens kokybė

Baltymai, hormonai ir augimo faktoriai

Jaučio embriono kraujo serumas (FBS)

pH indikatorius

Fenolio raudonasis

Kita

Biotinas  
Hidroksiprolinas  
Glutatonas

Buferiai

Natrio bikarbonatas  
HEPES

Energetiniai substratai

Gliukozė  
Inozitolis

Druskos ir jonai

Natrio chloridas  
Cholino chloridas

Kalčio nitratas

Kalio chloridas

Magnio sulfatas

Natrio fosfatas

Antibiotikas

Gentamicino sulfatas

Vitaminai ir mikroelementai

Folio rūgštis

Nikotinamidas

Riboflavinas

Tiaminas

Pantotėninė rūgštis

Kobalaminas

Piridoksinas

Aminobenzoinė rūgštis

**KOKYBĖS UŽTIKRINIMAS****STERILUMAS**

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

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

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

**REIKALINGOS, BET PAKUOTĖJE NEPATEIKTOS MEDŽIAGOS IR ĮRANGA**

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

## MĒGINIŲ ĒMIMAS IR RUOŠIMAS

Viso kraujo ląstelių kultūrų citogenetinės analizės sėkmei įtakos turi mėginio paėmimo metu normaliai funkcionuojančių limfocitų kiekis. Šiam kiekiui poveikio gali turėti infekcija ir vaistai, todėl, jei tik įmanoma, tiriamieji 7 dienas prieš kraujo ėmimą citogenetiniams tyrimams neturėtų vartoti vaistų. Panašiai mitozinis indeksas gali labai sumažėti anerginių kai kurių ligų stadijų metu (pvz., Hodžkinio ligos, sarkoidozės ir kt.), taip pat, ne taip smarkiai, – sveikoms moterims vėlyvuojų nėštumo laikotarpiu. Limfocitų kultūroms ruošiamų kraujo mėginių negalima maišyti su konservantais. Kritiškai svarbu laikytis aseptikos reikalavimų. Jei įmanoma, kraujo mėginius reikia tirti nedelsiant. Esant absoliučiai būtinybei, juos galima laikyti 2 °C–8 °C temperatūroje, bet ne ilgiau kaip 48 valandas.

## PARUOŠIMAS NAUDOTI

„CHANG Medium MF“ terpę 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 flakonius ir, nusistovėjus iki 37 °C būsenos, tuoj pat naudokite kaulų čiulpu ląstelių kultūroms.

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

## NAUDOJIMO NURODYMAI

Citogenetiniams tyrimams naudojami ir viso kraujo, ir išskirtų leukocitų mėginiai, bet pirmieji yra paprastesni ir plačiau analizuojami įprastinių tyrimų metu. Kaip ir visų ląstelių kultūrų auginimo atveju, optimalūs rezultatai priklauso nuo tinkamų kultivavimo sąlygų sukūrimo. Santykinis aktyvios PHA koncentracijos kiekis įvairių serijų reagentuose gali skirtis, todėl gali būti pravartu tirti dvi PHA koncentracijas.

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

### A. Viso kraujo mikrokultūrų ruošimas

1. Į mėgintuvėlį su heparinu be fenolio paimkite 5–20 ml kraujo ir vartydami sumaišykite.
2. PHA atskieskite steriliu švirkštu įšvirškdami 5 ml sterilius distiliuoto vandens.
3. Laikydami metodinių aseptikos reikalavimų, paruoškite reikalingą „CHANG Medium MF“ (mikrokultūrų terpės) kiekį, kiekvienam iš dviejų centrifuginių mėgintuvėlių su kraujo mėginiu skirdami po 5 ml.
4. „CHANG Medium MF“ terpę išpilstykite į atitinkamai paženklintus sterilius užsakomus centrifuginius mėgintuvėlius ir aseptiškai įlašinkite po 0,1 ml paruošto PHA tirpalo.
5. Prieš pat kultivavimą sterilia 1 ml pipete pridėkite po 0,4 ml heparinizuoto kraujo. Kūdikų ir vaikų atveju naudokite 0,3 ml kraujo, o nėščių moterų – 0,5 ml.
6. Kultūras inkubuokite 37 °C temperatūroje 72 valandas. Kūdikų ir vaikų mėginių atveju vieną iš dviejų kultūrų inkubuokite 37 °C temperatūroje 48 valandas. Nėščių moterų atveju vieną iš dviejų kultūrų galima inkubuoti 37 °C temperatūroje 96 valandas. Kiekvieno mėgintuvėlio turinį kasdien pavartydami sumaišykite.
7. Likus 16–18 val. iki timidino įpylimo, įpilkite 0,05 ml (50 μl)/5 ml darbinio metotreksato tirpalo.
8. Atlikę metotreksato sinchronizavimą (likus 5–6 val. iki ląstelių surinkimo), į kiekvieną kultūrą įpilkite 0,1 ml (100 μl)/5 ml darbinio timidino tirpalo.

### B. Kultūrų surinkimas

1. Prieš ląstelių surinkimą 37 °C vandens vonelėje pašildykite hipotoninį tirpalą (75 mM kalio chloridas).
2. Į kiekvieną kultūrą įlašinkite po 0,5 μl kolcemido tirpalo.
3. Atsargiai sumaišykite ir grąžinkite į 37 °C inkubatorių.
4. Po 30 minučių kultūras išimkite iš inkubatoriaus.
5. Kultūras 10 minučių centrifuguokite stalinėje centrifugoje esant 1000 apskų per minutę.
6. Didžiąją dalį supernatanto nusiurbkite ir išmeskite.
7. Nuosėdas resuspenduokite 6–8 ml 75 mM kalio chlorido tirpalo, 10 minučių pašildyto iki 37 °C temperatūros.
8. Centrifuguokite pagal 5 etapo nurodymus ir išmeskite supernatantą.
9. Nuolat purtydami sukurinėje maišyklėje, į nuosėdas Pastero pipete lėtai pridėkite 6–8 ml šviežiai paruošto modifikuoto Kornua fiksatyvo (3 dalys absoliučiojo metanolio ir 1 dalis ledinės acto rūgšties). Fiksatyvą iš pradžių lašinkite, o po to leiskite lėta srovele, kad sumažintumėte ląstelių pažeidimo ir gumulėlių susidarymo galimybę.
10. 10 minučių palaikykite kambario temperatūroje.
11. Centrifuguokite pagal 5 etapo nurodymus, kaip ir prieš tai nusiurbkite viršnuosėdinį skystį ir resuspenduokite nuosėdas lėtai sulsleidami dar 5 ml fiksatyvo.
12. Dar du kartus pakartokite 11 etapą, paskutinį kartą resuspenduodami 0,5 ml fiksatyvo kiekiu. Iš šios ląstelių suspensijos ruoškite tepinėlius analizei. Būtina saugotis, kad nesujudintumėte ląstelių.

### C. Tepinėlių preparatų ruošimas

1. Objektiniai stikliai turi būti nepriekaištingai švarūs. Tinkama valymo procedūra būtų per naktį pamerkti stiklelius chromo rūgštyje, o po to mažiausiai pusvalandį plauti po tekančiu vandeniu ir nublizginti stiklo šluoste.
2. Į objektinio stiklelio centrą 8–10 cm (3–4 col.) atstumu nuo stiklelio viršaus užlašinkite 1 ar 2 lašus resuspenduoto ląstelių preparato ir leiskite pasklisti.
3. Filtriniu popieriumi palei stiklelio kraštus nušluostykite fiksatyvo perteklių.
4. Vos tik pasirodžius Niutono žiedams, atsargiai papūskite oro visiškam tepinėlio nudžiūvimui pagreitinti.
5. Dažykite Giemsa dažais ir fiksukite prie stiklelių.



## **KLINIKINIS TAIKYMAS**

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

## **LAIKYMAS IR STABILUMAS**

Iki naudojimo „CHANG Medium MF“ terpę reikia laikyti užšaldytą, žemesnėje kaip  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Laikant užšaldytą, „Chang Medium MF“ terpė išlieka stabili iki tinkamumo datos, pažymėtos butelio etiketėje. Atitirpinus, nesunaudotą produkto likutį galima išpilstyti darbinėmis dalimis ir vėl užšaldyti (daugiausia du kartus) vėlesniam naudojimui arba sandariai uždengus laikyti  $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje iki 30 dienų. Saugoti nuo fluorescencinių spindulių.

## **ATSARGUMO PRIEMONĖS IR ĮSPĖJIMAI**

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

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



**KULLANIM ENDİKASYONU**

CHANG Medium MF sitogenetik analiz amaçları doğrultusunda periferik kan ve diğer numunelerin kültürünün yapılmasında kullanıma yöneliktir.

**CİHAZ TANIMI**

CHANG Medium MF %20 FSS, 2 mM glutamin, 20 mM HEPES tamponu ve Gentamisin Sülfat antibiyotiklerinden (35 µg/mL) oluşan RPMI içeren, mitojensiz, kullanıma hazır bir vasattır. CHANG Medium MF, periferik kan ve başka hücrelerin gelişimini optimize etmek için fitohemaglutinin (PHA) gibi mitojenik ajanların eklenmesini gerektirebilir. Gerekli PHA (veya diğer mitojen) konsantrasyonu ayrı laboratuvar tarafından belirlenmelidir.

**BİLEŞENLER**

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

**KALİTE GÜVENCE****STERİLİTE**

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

Örnek kaynağı, kültür koşulları ve reaktiflerin seçimi dahil birkaç faktör elde edilen sonucu etkileyebilir. Kullanıcıların rutin kullanıma sokmadan önce her yeni reaktif partisini bilinen uygun aktiviteye sahip referans materyalle birlikte çalışmalarını önerilir. Her CHANG Medium MF lotu periferik kan kullanılarak bir kontrol vasatına göre mitotik indeks, kromozom uzunluğu ve kalite için değerlendirilir. Sonuçlar lota özel bir Analiz Sertifikasında bildirilir.

**GEREKLİ AMA SAĞLANMAYAN MATERYAL VE EKİPMAN**

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

## NUMUNE TOPLAMA VE MUAMELE

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

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

## KULLANIM HAZIRLIĞI

CHANG Medium MF buzdolabında (2°C - 8°C) gece boyunca çözüldükten 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 dengeleyin.

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

## KULLANMA TALİMATI

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

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

### A. Tam Kan Mikrokültürleri Hazırlanması

1. Fenol içermeyen heparin içinde 5 - 20 mL kan toplayın ve inversiyonla karıştırın.
2. PHA ürününü steril bir şırınga kullanarak 5 mL steril distile su ekleyerek sulandırın.
3. Aseptik teknik kullanarak kan örneği başına iki santrifüj tüpünün her biri için 5 mL ayrıarak gerekli CHANG Medium MF (mikrokültür vasatı) hacmini hazırlayın.
4. CHANG Medium MF ürününü uygun şekilde etiketlenmiş steril vidalı kapaklı santrifüj tüplerine verin ve aseptik olarak 0,1 mL sulandırılmış PHA ekleyin.
5. Kültürden hemen önce steril bir 1 mL pipet kullanarak 0,4 mL heparinize kan ekleyin. Bebekler ve çocuklar için 0,3 mL ve hamile kadınlar için 0,5 mL kan kullanın.
6. Kültürleri 37°C'de 72 saat inkübe edin. Bebek ve çocuk örnekleri için iki kültürden birini 37°C'de 48 saat inkübe edin. Hamile kadınlar için iki kültürden biri 37°C'de 96 saat inkübe edilebilir. Her tüpü her gün ters düz ederek karıştırın.
7. Timidin eklenmesinden 16 - 18 saat önce her kültüre 0,05 mL (50 µl)/5 mL metotreksat çalışma çözümü ekleyin.
8. Metotreksat senkronizasyonu tamamlandıktan sonra (toplamadan 5 - 6 saat önce) her kültüre 0,1 mL (100 µl)/5 mL timidin çalışma çözümü ekleyin.

### B. Kültürlerden Toplama

1. Hipotonik çözümü (75 mM potasyum klorür) toplama öncesinde bir 37°C su banyosunda önceden ısıtın.
2. Her kültüre 0,5 µl Colcemid çözümü ekleyin.
3. Hafifçe karıştırın ve 37°C inkübatoře geri koyun.
4. Kültürleri 30 dakikadan sonra inkübatoörden çıkarın.
5. Kültürleri bir tezgah santrifüjünde 10 dakika boyunca 1000 devir/dk hızında santrifüjleyin.
6. Süpernatant sıvının çoğunu alın ve atın.
7. Pelleti 10 dakika boyunca 37°C'ye önceden ısıtılmış 6 - 8 mL 75 mM potasyum klorür çözümünde tekrar süspansiyon haline getirin.
8. Adım 5'teki gibi tekrar santrifüjleyin ve süpernatantı atın.
9. Bir Pasteur pipeti kullanarak yeni hazırlanmış modifiye Carnoy fiksatifinden (3 kısım mutlak metanol: 1 kısım glisyal asetik asit) 6 - 8 mL'yi pellete bir vorteks karıştırıcıda sürekli olarak ajitasyon sırasında yavaşça ekleyin. Hücre hasarı ve topak oluşmasını en aza indirmek üzere fiksatif önce damla damla ve sonra çok ince bir akım halinde ekleyin.
10. Oda sıcaklığında 10 dakika bırakın.
11. Adım 5'teki gibi santrifüjleyin ve süpernatant sıvıyı önceki gibi alın ve pelleti tekrar süspansiyon haline getirmek için ek 5 mL fiksatif ekleyin.
12. Adım 11'i iki kez daha tekrarlayın ve son olarak 0,5 mL fiksatif içinde tekrar süspansiyon haline getirin. Bu hücre süspansiyonunu, incelemek için lamalar hazırlamak üzere kullanın. Hücrelerin ajitasyonunda kaçınmak için dikkatli olunmalıdır.

### C. Lamaların Hazırlanması

1. Lamalar son derece temiz olmalıdır. Uygun bir temizlik işlemi lamaları gece boyunca kromik aside batırmak ve sonrasında en az yarım saat boyunca akan suda yıkayıp bir cam bezle parlatmaktır.
2. Tekrar süspansiyon haline getirilmiş hücre preparatından 1 - 2 damlayı bir cam lamin 8 - 10 cm (3 - 4 inç) üzerinden lamin ortasına uygulayın ve dağılmasını bekleyin.
3. Fazla fiksatif lam kenarlarından filtre kağıdıyla silin.
4. Newton Halkaları ilk belirldiğinde lamin son kurumasını hızlandırmak üzere hafifçe üfleyin.
5. Giemsa ile boyayın ve monte edin.

## **KLİNİK UYGULAMALAR**

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

## **SAKLAMA VE STABİLİTE**

CHANG Medium MF ürününü kullanıma hazır oluncaya kadar dondurulmuş olarak -10°C altında saklayın. Chang Medium MF dondurulmuş olarak muhafaza edildiğinde şişe etiketinde gösterilen son kullanma tarihine kadar stabildir. Çözdükten sonra kullanılmamış herhangi bir ürün çalışma alikotlarına aktarılıp daha sonra kullanılmak üzere (maksimum iki kez) tekrar dondurulabilir veya kapağı sıkıca kapatılıp 2 - 8°C'de 30 güne kadar saklanabilir. Floresan ışıktan koruyun.

## **ÖNLEMLER VE UYARILAR**

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

CHANG Medium MF, FSS içerir ve evrensel laboratuvar önlemlerine göre kullanılmalıdır. Vasat, bakteriyel kontaminasyon potansiyelini azaltmak için bir antibiyotik (gentamisin sülfat) içerir ama vasatı verirken daima aseptik teknikler kullanılmalıdır. Kırmızı renkte olmayan herhangi bir vasatı kullanmayın.



## INDIKÁCIA NA POUŽITIE

CHANG Medium MF je určené na kultiváciu periférnej krvi a iných vzoriek pre účely cytogenetickej analýzy.

## POPIS ZARIADENIA

CHANG Medium MF je médium bez obsahu mitogénov pripravené na použitie zložené z RPMI obsahujúceho 20 % FBS, 2 mM glutamínu, 20 mM pufru HEPES a antibiotikum gentamicínsulfát (35 µg/ml). CHANG Medium MF si môže vyžadovať prídanie koncentrických činidiel, ako napríklad fytohemaglutinín (PHA), na optimalizáciu rastu periférnej krvi a iných buniek. Požadovaný koncentraciu PHA (alebo iných mitogénov) si stanoví jednotlivé laboratórium.

## ZLOŽKY

### Aminokyseliny

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

### Voda

kvalita vody na injekciu

### Bielkoviny, hormóny a rastové faktory

fetálne bovinné sérum (FBS)

### Indikátor pH

fenolová červen

### Iné

biotín  
 hydroxyprolín  
 glutatión  
 Pufré  
 hydrogénuhličitan sodný  
 HEPES

### Energetické substráty

glukóza  
 inositol

### Soli a ióny

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

### Antibiotikum

gentamicínsulfát

### Vitámíny a stopové prvky

kyselina listová  
 nikotinamid  
 riboflavin  
 tiamín  
 kyselina pantoténová  
 kobalamín  
 pyridoxín  
 kyselina aminobenzoová

## KONTROLA KVALITY

### STERILITA

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

Viacere faktory, vrátane zdroja vzorky, podmienok kultivácie a výberu reagensí, 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 MF sa hodnotí použitím periférnej krvi na mitotický index, dĺžku chromozómov a kvalitu porovnaním s kontrolným médiom. Výsledky sa zaznamenávajú na certifikát analýzy pre špecifickú šaržu.

## VYŽADOVANÉ, NO NEDODÁVANÉ MATERIÁLY A VYBAVENIE

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

## ODBER VZORIEK A MANIPULÁCIA SO VZORKAMI

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

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

## PRÍPRAVA NA POUŽITIE

CHANG Medium MF sa má rozmraziť v chladničke cez noc (2 °C – 8 °C) a potom jemne premiešať, aby sa zaisťovala homogénnosť. Asepticky nadávkujte 10 ml média do sterilných fľaštičiek na kultúru a ustáťte na teplote 37 °C na okamžité použitie pre kultúry kostnej drene.

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

## NÁVOD NA POUŽITIE

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

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

### A. Príprava mikrokultúr z plnej krvi

1. Odoberte 5 – 20 ml čerstvej krvi do heparínu neobsahujúceho fenol a premiešajte prevrátením.
2. PHA rekonštituujte pridaním 5 ml sterilnej destilovanej vody pomocou sterilnej striekačky.
3. Pomocou aseptickkej techniky pripravte požadovaný objem CHANG Medium MF (mikrokultivačné médium), pričom ponechajte po 5 ml v oboch skúmavkách na odstreďovanie na každú vzorku krvi.
4. CHANG Medium MF nadávkujte do primerane označených sterilných skúmaviek na odstreďovanie so závitovým uzáverom a asepticky pridajte 0,1 ml rekonštituovaného PHA.
5. Tesne pred kultiváciou pridajte 0,4 ml heparinizovanej krvi pomocou sterilnej 1 ml pipety. Pre dojčatá použite 0,3 ml krvi a pre tehotné ženy 0,5 ml.
6. Kultúry inkubujte pri teplote 37 °C 72 hodín. Pre vzorky od dojčiat a detí inkubujte jednu z dvoch kultúr pri teplote 37 °C 48 hodín. Pre tehotné ženy možno jednu z dvoch kultúr inkubovať pri teplote 37 °C 96 hodín. Každú skúmavku premiešajte prevrátením každý deň.
7. Do každej kultúry pridajte 0,05 ml (50 µl)/5 ml pracovného roztoku metotrexátu 16 – 18 hodín pred pridaním tymidínu.
8. Do každej kultúry pridajte 0,1 ml (100 µl)/5 ml pracovného roztoku tymidínu po dokončení synchronizácie metotrexátom (5 – 6 hodín pred zberom).

### B. Zber kultúr

1. Hypotonický roztok (75 mM chloridu draselného) pred odberom vopred zohrejte vo vodnom kúpeli s teplotou 37 °C.
2. Do každej kultúry pridajte 0,5 µl roztoku Cocelmidu.
3. Jemne premiešajte a vráťte do inkubátora s teplotou 37 °C.
4. Kultúry vyberte z inkubátora po 30 minútach.
5. Kultúry odstreďte v laboratórnej odstredivke na 1 000 otáčok za minútu 10 minút.
6. Odstráňte a zlikvidujte väčšinu supernatantovej tekutiny.
7. Peletu resuspendujte v 6 až 8 ml 75 mM roztoku chloridu draselného vopred zahriateho na teplotu 37 °C 10 minút.
8. Odstreďte tak ako v kroku 5 a zlikvidujte supernatant.
9. Pomocou Pasteurovej pipety pomaly pridajte 6 až 8 ml čerstvo pripraveného modifikovaného fixačného roztoku Carnoy (3 časti absolútny metanol : 1 časť ľadová kyselina octová) do pelety, pričom ju neustále pretrepávajte vo vírivom mixéri. Spočiatku pridávajte fixačný roztok po kvapkách a potom pomalým cicerkom, aby sa minimalizovalo poškodenie buniek a vytvorenie zhlukov.
10. Nechajte postáť pri izbovej teplote 10 minút.
11. Odstreďte tak ako v kroku 5 a supernatantovú tekutinu odstráňte tak, ako predtým, a pomaly pridávajte ďalších 5 ml fixačného roztoku na resuspendovanie pelety.
12. Krok 11 zopakujte ešte dvakrát a nakoniec resuspendujte v 0,5 ml fixačného roztoku. Túto bunkovú suspenziu použite na prípravu sklíčok na vyšetrenie. Dajte pozor, aby sa bunky nepomiešali.

### C. Príprava sklíčok

1. Sklíčka musia byť absolútne čisté. Vhodný čistiaci postup je namočiť sklíčka do kyseliny chromitej na noc a potom ich premyť tečúcou vodou najmenej pol hodiny a vyleštiť handričkou na sklo.
2. Aplikujte 1 až 2 kvapky prípravku s resuspendovanými bunkami do stredu sklíčka z výšky 8 – 10 cm (3 – 4 palce) nad sklíčkom a nechajte ich rozliahnúť sa.
3. Nadbytočný fixačný roztok utrite z okrajov sklíčka filtrovacím papierom.
4. Hneď ako sa objavia Newtonove krúžky, jemne pofúkajte, aby sa urýchlilo konečné uschnutie sklíčka.
5. Zafarbite farbivom Giemsa a nainštalujte.



## **KLINICKÉ APLIKÁCIE**

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

## **UCHOVÁVANIE A STABILITA**

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

## **BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA A VAROVANIA**

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

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



## ПОКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

CHANG Medium MF е предназначена за употреба при култивиране на периферна кръв и други спесимени за целите на цитогенетичен анализ.

## ОПИСАНИЕ НА ИЗДЕЛИЕТО

CHANG Medium MF е среда без митогени, готова за употреба, която се състои от RPMI среда, съдържаща 20% FBS (фетален говежди серум), 2 mM glutамин, 20 mM буфер HEPES и антибиотик гентамицин сулфат (35 µg/ml). CHANG Medium MF може да изисква добавяне на митогенни агенти, например фитохемаглутинин (PHA) за оптимизиране на растежа на периферната кръв и други клетки. Необходимата концентрация на PHA (или други митогени) трябва да се определи от конкретната лаборатория.

## КОМПОНЕНТИ

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

## КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

### СТЕРИЛНОСТ

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

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

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

## НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ И ОБОРУДВАНЕ, КОИТО НЕ СА ДОСТАВЕНИ

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

## **СЪБИРАНЕ И ОБРАБОТКА НА СПЕСИМЕН**

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

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

## **ПОДГОТОВКА ЗА УПОТРЕБА**

CHANG Medium MF трябва да се размрази за една нощ в хладилник (2 – 8° С) и след това внимателно да се размесе, за да се осигури хомогенност. Аспетично накапете 10 ml от средата в стерилни слайд-флакони за култури и еквилибрайте до 37° С за незабавна употреба за култури на костен мозък.

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

## **УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА**

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

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.

### **А. Подготовка на микрокултури на цяла кръв**

1. Вземете 5 – 20 ml прясна кръв в хепарин без фенол и смесете с преобръщане.
2. Реконституирайте РНА, като добавите 5 ml стерилна дестилирана вода с помощта на стерилна спринцовка.
3. Чрез аспетичен метод пригответе необходимия обем CHANG Medium MF (среда за микрокултури), предвиджайки 5 ml за всяка от двете центрофужни епруветки на кръвна проба.
4. Накапете CHANG Medium MF в подходящо обозначени, стерилни, затворени с винтова капачка, центрофужни епруветки и аспетично добавете 0,1 ml реконституиран РНА.
5. Непосредствено преди култивиране добавете 0,4 ml хепаринизирана кръв чрез стерилна пипета от 1 ml. Използвайте 0,3 ml кръв за бебета и деца и 0,5 ml за бременни жени.
6. Инкубирайте културите при 37° С за 72 часа. За проби от бебета и деца инкубирайте една от двете култури при 37° С за 48 часа. За бременни жени една от двете култури може да бъде инкубирана при 37° С за 96 часа. Ежедневно размесвайте с преобръщане всяка епруветка.
7. Добавете 0,05 ml (50 µl)/5 ml работен разтвор от метотрексат към всяка култура 16 – 18 часа преди добавяне на тимидин.
8. Добавете 0,1 ml (100 µl)/5 ml работен разтвор от тимидин към всяка култура след завършване на синхронизация с метотрексат (5 – 6 часа преди събиране).

### **В. Събиране на културите**

1. Затоплете предварително хипотоничния разтвор (75 mM калиев хлорид) във водна баня при 37° С преди събиране.
2. Добавете 0,5 µl разтвор на колцемид към всяка култура.
3. Смесете внимателно и върнете в инкубатора при 37° С.
4. Отстранете културите от инкубатора след 30 минути.
5. Центрофугирайте културите в настолна центрофуга при 1000 rpm за 10 минути.
6. Отстранете повечето супернатант и го изхвърлете.
7. Ресуспендирайте пелетата в 6 до 8 ml разтвор на калиев хлорид 75 mM, предварително затоплен до 37° С за 10 минути.
8. Центрофугирайте, както в стъпка 5, и изхвърлете супернатанта.
9. С помощта на пипета тип Пастър бавно добавете 6 до 8 ml прясно приготвен модифициран фиксиращ разтвор на Карной (3 части чист метанол: 1 част ледена оцетна киселина) към пелетата, докато размесвате непрекъснато във вихров миксер. Добавете фиксиращия разтвор първо чрез накапване, след това чрез бавна и тънка струя, за да намалите до минимум увреждането на клетки и формирането на бучки.
10. Оставете на стайна температура за 10 минути.
11. Центрофугирайте, както в стъпка 5, отстранете супернатанта, както преди това, и бавно добавете допълнително 5 ml фиксиращ разтвор, за да ресуспендирайте пелетата.
12. Повторете стъпка 11 още два пъти, като ресуспендирайте окончателно в 0,5 ml фиксиращ разтвор. Използвайте тази суспензия на клетки, за да пригответе слайдове за изследване. Трябва да се внимава, за да се избегне размесване на клетките.

### **С. Подготовка на слайдове**

1. Слайдовете трябва да са идеално чисти. Подходяща процедура за почистване е на кисване на слайдовете в хромна киселина за една нощ, след което те трябва да се измият на течаща вода за поне половин час и да се полират с кърпа за стъкло.
2. Приложете 1 или 2 капки от препаратa с ресуспендирани клетки върху центъра на стъклен слайд от разстояние 8 – 10 cm (3 – 4 инча) над слайда и оставете да се разстеле.
3. Избършете излишното количество фиксиращ разтвор от краищата на слайда с помощта на филтърна хартия.
4. При първото появяване на нютонови пръстени, продухайте внимателно, за да ускорите окончателното изсъхване на слайда.
5. Оцветете с Гимза и поставете обемозаместителна среда.

### **КЛИНИЧНИ ПРИЛОЖЕНИЯ**

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

### **СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ**

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

### **ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ**

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

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



## **INDIKACIJE ZA UPOTREBU**

Medij CHANG Medium MF namijenjen je za uzgoj kulture periferne krvi i drugih uzoraka u svrhe citogenetičke analize.

## **OPIS PROIZVODA**

Medij CHANG Medium MF ne sadrži mitogene, spreman je za upotrebu i sastoji se od medija RPMI koji sadrži 20 % FBS-a, 2 mmol/l glutamina, 20 mmol/l pufera HEPES i antibiotika gentamicinsulfat (35 µg/ml). Mediju CHANG Medium MF možda će trebati dodati mitogeno sredstvo kao što je fitohemaglutinin (PHA) kako bi se optimirao rast stanica periferne krvi i drugih stanica. Svaki laboratorij mora utvrditi potrebnu koncentraciju PHA-a (ili drugih mitogena).

## **KOMPONENTE**

### Aminokiselina

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

### Voda

Kvaliteta u skladu s propisano  
za vodu za injekcije  
Proteini, hormoni i čimbenici rasta  
Fetalni goveđi serum (FBS)  
pH indikator  
Fenol crveno  
Ostalo  
Biotin  
Hidroksiprolin  
Glutation  
Puferi  
Natrijev hidrogenkarbonat  
HEPES  
Energetski supstrati  
Glukoza  
Inozitol

### Soli i ioni

Natrijev klorid  
Kolinijev klorid  
Kalcijev nitrat  
Kalijev klorid  
Magnezijev sulfat  
Natrijev fosfat  
Antibiotik  
Gentamicinsulfat  
Vitamini i elementi u tragovima  
Folna kiselina  
Nikotinamid  
Riboflavin  
Tijamin  
Pantotenska kiselina  
Kobalamin  
Piridoksin  
Aminobenzoatna kiselina

## **OSIGURANJE KVALITETE**

### **STERILNOST**

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

Više čimbenika – uključujući izvor uzorka, uvjete uzgoja kulture i odabir reagensa – može utjecati na konačan rezultat. Korisnicima se preporučuje da 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.

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

## **POTREBNI MATERIJALI I OPREMA KOJI NISU PRILOŽENI**

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

## **PRIKUPLJANJE UZORAKA I RUKOVANJE UZORCIMA**

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

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

## **PRIPREMA ZA UPOTREBU**

Medij CHANG Medium MF 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 MF formiraju kristali kalcijeva karbonata. Nije zabilježeno da prisutnost tih kristala ima ikakvo štetno djelovanje na performanse proizvoda.

## **UPUTE ZA UPOTREBU**

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

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

### **A. Priprema mikrokultura pune krvi**

1. Prikupiti 5 – 20 ml svježih krvi u heparinu koji ne sadrži fenol i miješati prevrtanjem.
2. Rekonstituirati PHA dodajući 5 ml sterilne destilirane vode sterilnom štrcaljkom.
3. Aseptičkim metodama pripremiti potreban volumen medija CHANG Medium MF (medij za mikrokulturu) pri čemu je za svaku od dvije epruvete za centrifugu potrebno 5 ml medija po uzorku krvi.
4. Prenijeti medij CHANG Medium MF u sterilne epruvete za centrifugu koje imaju čep s navojem i na odgovarajući su način označene te aseptički dodati 0,1 ml rekonstituirane PHA-e.
5. Neposredno prije kultiviranja sterilnom pipetom od 1 ml dodati 0,4 ml heparinizirane krvi. Za dojenčad i djecu upotrijebiti 0,3 ml krvi, a za trudnice 0,5 ml.
6. Inkubirati kulture 72 sata na 37 °C. Za uzorke dojenčadi i djece inkubirati jednu od dvije kulture 48 sati na 37 °C. Za trudnice inkubirati jednu od dvije kulture 96 sati na 37 °C. Svaki dan svaku epruvetu promiješati prevrtanjem.
7. U svaku kulturu dodati 0,05 ml (50 µl)/5 ml radne otopine metotreksata 16 – 18 sati prije dodavanja timidina.
8. U svaku kulturu dodati 0,1 ml (100 µl)/5 ml radne otopine timidina nakon završetka sinkronizacije metotreksatom (5 – 6 sati prije prikupljanja).

### **B. Prikupljanje kultura**

1. Zagrijati hipotoničnu otopinu (75 mmol/l kalijevog klorida) u vodenoj kupelji temperiranoj na 37 °C prije prikupljanja.
2. U svaku kulturu dodati 0,5 µl otopine kolcemida.
3. Lagano promiješati i vratiti u inkubator na 37 °C.
4. Izvaditi kulture iz inkubatora nakon 30 minuta.
5. Centrifugirati kulture u stolnoj centrifugi 10 minuta na 1.000 o/min.
6. Ukloniti većinu tekućeg supernatanta i odložiti ga.
7. Obnoviti suspenziju taloga u 6 – 8 ml otopine kalijevog klorida od 75 mmol/l koja je prije toga 10 minuta zagrijavana na 37 °C.
8. Centrifugirati kako je opisano u 5. koraku i odložiti supernatant.
9. Pasteurovom pipetom u talog polako dodati 6 – 8 ml svježih pripremljenog modificiranog Carnoyevog fiksativa (3 dijela apsolutnog metanola i 1 dio ledene octene kiseline) neprestano miješajući u vrtložnoj miješalici. Fiksativ najprije dodavati ukapavanjem, a zatim sporim tankim mlazom kako bi se oštećivanje stanica i nastanak grudica sveli na najmanju moguću mjeru.
10. Ostaviti na sobnoj temperaturi 10 minuta.
11. Centrifugirati kako je opisano u 5. koraku i ukloniti tekući supernatant kako je prethodno navedeno te polako dodati još 5 ml fiksativa kako bi se obnovila suspenzija taloga.
12. Još dva puta ponoviti 11. korak i na kraju obnoviti suspenziju s 0,5 ml fiksativa. Koristiti ovu suspenziju stanica kako bi se pripremila stakalca za pregled. Valja paziti da ne dođe do mučkanja stanica.

### **C. Priprema stakalaca**

1. Stakalca moraju biti besprijekorno čista. Odgovarajući postupak čišćenja jest ostaviti stakalca da se preko noći namažu u kromnoj kiselini, nakon toga ih ispirati pod tekućom vodom najmanje pola sata i uložiti krpom za staklo.
2. S visine od 8 – 10 cm (3 – 4 inča) na sredinu stakalca staviti 1 ili 2 kapi obnovljene suspenzije pripremljena stanica i omogućiti joj da se razlije po stakalcu.
3. Filtarskim papirom obrisati višak fiksativa s rubova stakalca.
4. Čim se pojave Newtonovi kolobari, nježno puhati kako bi se ubrzalo završno sušenje stakalca.
5. Bojiti Giemsa bojom i uklopiti.



## **KLINIČKE PRIMJENE**

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

## **POHRANA I STABILNOST**

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

## **MJERE OPREZA I UPOZORENJA**

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

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



**INDIKAZZJONI GHALL-UŻU**

CHANG Medium MF huwa mahsub għall-użu fit-tkabbir ta' demm periferali u kampjuni oħra għall-għanijiet ta' analiżi ċitogenika.

**DESKRIZZJONI TAL-APPARAT**

CHANG Medium MF huwa midjum mingħajr mitoġeni u lest biex jintuża li fih 20% FBS, 2 mM glutamine, 20 mM HEPES bafer u l-antibijotiku Gentamicin Sulfate (35 µg/mL). CHANG Medium MF jista' jkun jeħtieġ iż-żieda ta' aġenti mitoġeniċi, bħal phytohemagglutinin (PHA) sabiex jiġi ottimizzat it-tkabbir ta' demm periferali u ċelloli oħra. Il-koncentrazzjoni meħtieġa ta' PHA (jew mitoġeni oħra) għandha tiġi ddeterminata mil-laboratorju individwali.

**KOMPONENTI**

<u>Aċidi Amminici</u>	<u>Ilma</u>	<u>Imluħa u Joni</u>
Arginine	Kwalità tal-WFI (Ilma għall-Injezzjonijiet)	Sodium chloride
Asparagine		Choline chloride
Aspartic Acid	<u>Proteini, Ormoni u Fatturi ta' Tkabbir</u>	Calcium nitrate
Cystine	Fetal bovine serum (FBS)	Potassium chloride
Glutamic Acid	<u>Indikatur tal-pH</u>	Magnesium sulfate
Glutamine	Phenol Red	Sodium phosphate
Glycine	<u>Oħrajn</u>	<u>Antibijotiku</u>
Histidine	Biotin	Gentamicin Sulfate
Isoleucine	Hydroxyproline	<u>Viċtami u mikroelementi</u>
Leucine	Glutathione	Folic acid
Lysine	<u>Baferi</u>	Nicotinamide
Methionine	Sodium bicarbonate	Riboflavin
Phenylalanine	HEPES	Thiamine
Proline	<u>Substrati tal-Energija</u>	Pantothenic acid
Serine	Glucose	Cobalamin
Threonine	Inositol	Pyridoxine
Tryptophan		Aminobenzoic acid
Tyrosine		
Valine		

**ASSIGURAZZJONI TAL-KWALITÀ**

**STERILITÀ**

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

Bosta fatturi inkluż is-sors tal-kampjuni, il-kundizzjonijiet tal-tkabbir u l-għażla tar-reagenti jistgħu jinfluenzaw 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 jintuża b'mod regolari.

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

**MATERJALI U TAGHMIR MEHTIEĠ IŻDA MHUX IPPROVDUT**

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

## II-ĠBIR TAL-KAMPJUNI U L-IMMANIĠĠJAR

Is-suċċess tal-kolturi ta' demm sħiħ għall-analiżi ċitogenetika jiġi influwenzat mil-livell ta' limfociti b'funzjoni normali fil-hin tat-tehid tal-kampjuni. Minhabba li dan il-livell jista' jiġi affetwat minn infezzjonijiet u mediċini, fejn hu possibbli l-pazjenti għall-istudji ċitogenetiċi m'għandhom ikunu hađu l-ebda mediċina matul is-7 jjiem ta' qabel il-ġbir tad-demm għat-testijiet. Bl-istess mod, jista' jkun hemm tnaqqis kbir fil-indiċi mitotiku matul il-fażijiet enerġiċi ta' ċertu mard (pereżempju l-marda ta' Hodgkin, sarkojođi, eċċ.) u, fuq skala iżgħar, f' individwi normali matul l-aħħar stadji tat-tqala. M'għanduz jidmeđ preżervativ lill-kampjuni tad-demm għat-tkabbir tal-limfociti. Tekniċi aseptiċi huma essenzjali.

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

## PREPARAZZJONI GĦALL-UŻU

CHANG Medium MF għandu jiġi maħlul matul il-lejl fi friġġ (2-8°C) imbagħad imħallat bil-mod sabiex tiġi żgurata l-omogeneità. B'mod aseptiku ddispensa 10 mL tal-midjum ġo flasks sterili tat-tkabbir u ekwilibra għal temperatura ta' 37°C għall-użu immedjat għal kulturi tat-mudullun.

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

## ISTRUZZJONIJET DWAR L-UŻU

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

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

### A. Il-Preparazzjoni ta' Mikrokulturi ta' Demm Sħiħ

1. Iġbor 5-20 mL ta' demm frisk ġo phenol-free heparin u għandni billi taqleb il-kontenitur rasu l' isfel.
2. Irrikonstitwixxi l-PHA billi żżid 5 mL ilma sterili distillat b'siringa sterili.
3. Permezz ta' teknika aseptika, ipprepara l-volum meħtieġ ta' CHANG Medium MF (midjum għall-mikrokulturi) billi tipprovvdvi 5 mL għal kull wieħed minn żewġ tubi taċ-ċentrifugu għal kull kampjun tad-demm.
4. Iddispensa CHANG Medium MF f'tubi taċ-ċentrifugu bit-tapp tal-kamin, sterili u ttikkettjati kif jixraq u b'mod aseptiku žid 0.1 mL PHA rikostitwit.
5. Immedjatament qabel it-tkabbir, žid 0.4 mL demm eparinizzat b'pipetta ta' 1 mL sterili. Uża 0.3 mL ta' demm għal trabi u tfal u 0.5 għal nisa tqal.
6. Inkuba l-kulturi f'temperatura ta' 37°C għal 72 siegħa. Fil-każ ta' kampjuni minn trabi u tfal, inkuba waħda miż-żewġ kulturi f'temperatura ta' 37°C għal 48 siegħa. Fil-każ ta' nisa tqal, waħda miż-żewġ kulturi tista' tiġi inkubata f'temperatura ta' 37°C għal 96 siegħa. F'awwad kull tubu billi ta' kuljum taqilbu rasu l' isfel.
7. Žid 0.05 mL (50 µL)/5 mL ta' soluzzjoni uttilizzabbli ta' methotrexate lill kull kultura 16-18-il siegħa qabel iż-żieda ta' thymidine.
8. Žid 0.1 mL (100 µL)/5 mL ta' soluzzjoni uttilizzabbli ta' thymidine lill kull kultura wara li tintemm is-sinkronizzazzjoni ta' methotrexate (5-6 sigħat qabel il-ħsad).

### B. Il-ħsad tal-Kulturi

1. Saħħan minn qabel is-soluzzjoni ipotonika (75 mM potassium chloride) ġo banjumarija b'temperatura ta' 37°C qabel il-ħsad.
2. Žid 0.5 µL ta' soluzzjoni ta' Colcemid lill kull kultura.
3. F'awwad bil-mod u erġa' poġġi fi-inkubatur bit-temperatura ta' 37°C.
4. Nehħi l-kulturi mill-inkubatur wara 30 minuta.
5. Iċċentrifuga l-kulturi f'ċentrifugu ta' fuq il-bank fuq 1,000 rpm għal 10 minuti.
6. Nehħi l-biċċa l-kbira tal-fluwidu tas-supernatant u armi.
7. Erġa' s'sospendi l-gerbuba f'6 sa 8 mL ta' soluzzjoni ta' 75 mM potassium chloride msahħna minn qabel għal temperatura ta' 37°C għal 10 minuti.
8. Iċċentrifuga bħal f'punt 5 u armi s-supernatant
9. Bl-użu ta' pipetta Pasteur bil-mod žid 6 sa 8 mL ta' preparazzjoni friska ta' fissattiv ta' Carnoy immodifikat (3 partijiet methanol assolut: parti 1 acetic acid għalċjal) lill-gerbuba waqt li thawwad bla waqfien fuq vortex mixer. Žid il-fissattiv qatra qatra fil-bidu, segwit minn ġenbien rqiġ ta' likwidu sabiex titnaqqas il-ħsara liċ-ċelloli u l-formazzjoni ta' ċapep.
10. F'ali f'temperatura ambjentali għal 10 minuti.
11. Iċċentrifuga bħal f'punt 5 u nehħi l-fluwidu tas-supernatant bħal qabel u bil-mod žid 5 mL oħra ta' fissattiv sabiex terġa' tissospendi l-gerbuba.
12. Irrepeti l-punt 11 għal darbejn oħra, u fl-aħħar erġa' s'sospendi f'0.5 mL ta' fissattiv. Uża din is-sospensjoni ta' ċelloli sabiex tipprepara s-slaġds biex jiġu ezaminati. Għandha tittiehed kull attenzjoni sabiex iċ-ċelloli ma jiġux mċaqlaqin.

### Ċ. Preparazzjoni tal-Slaġds

1. Is-slaġds għandhom ikunu perfettament nodfa. Proċedura xierqa tat-tindif hija li s-slaġds jiġu mghaddsa fi chromic acid matul il-lejl, imbagħad għandhom jiġu maħsula taht ilma ġieri għal mill-inqas nofs siegħa u xxottati sew b'biċċa għat-tazzi.
2. Applika qatra 1 jew 2 tal-preparazzjoni ta' ċelloli risospizi fiċ-ċentru ta' slide tal-ħġieġ minn distanza ta' 3 - 4 pulzieri (7.5 - 10 cm) mill-wiċċ tas-slide u hallihom jinfirxu.
3. Imsaħ il-fissattiv żejjeđ mit-truf tas-slide permezz ta' karta filtru.
4. Mal-ewwel dehra ta' Newton's Rings, onfoħ bil-mod biex thaffef l-aħħar trnixif tal-slaġd.
5. Applika l-kulurant Giemsa u mmonta.

## **APPLIKAZZJONIJIET KLINIĊI**

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

## **HAŻNA U STABILITÀ**

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

## **PREKAWZJONIJIET U TWISSIJIET**

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

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



**INDIKACIJE ZA UPORABO**

Medij CHANG Medium MF je namenjen za uporabo pri gojenju periferne krvi in drugih vzorcev za namene citogenetske analize.

**OPIS PRIPOMOČKA**

CHANG Medium MF je medij brez mitogenov, pripravljen za uporabo in sestavljen iz medija RPMI z 20 % FBS, 2 mM glutamina, 20 mM pufru HEPES in antibiotika gentamicinijev sulfat (35 µg/ml). Mediju CHANG Medium MF bo morda treba dodati mitogene učinkovine, kot je fitohemaglutinin (PHA), za optimizacijo rasti periferne krvi in drugih celic. Potrebno koncentracijo PHA (ali drugih mitogenih učinkovin) je treba določiti v posameznem laboratoriju.

**KOMPONENTE**Aminokisliline

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

Voda

Kakovost, ki ustreza vodi za injekcije  
Beljakovine, hormoni in rastni faktorji  
Serum govejega zarodka (FBS)

Indikator vrednosti pH

Fenol rdeče

Drugo

Biotin  
Hidroksiprolin  
Glutation  
Pufri  
Natrijev bikarbonat  
HEPES  
Energijski substrati  
Glukoza  
Inozitol

Soli in ioni

Natrijev klorid  
Holinklorid  
Kalcijev nitrat  
Kalijev klorid  
Magnezijev sulfat  
Natrijev fosfat  
Antibiotik  
Gentamicinijev sulfat  
Vitaminski elementi v sledovih  
Folna kislina  
Nikotinamid  
Riboflavin  
Tiamin  
Pantotenska kislina  
Kobalamin  
Piridoksin  
Aminobenzojska kislina

**ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI****STERILNOST**

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

Na dobljeni rezultat lahko vpliva več dejavnikov, vključno z virom vzorca, pogoji gojenja in izbiro reagentov. Uporabnikom svetujemo, da vsako novo serijo reagenta pred začetkom rutinske uporabe preskusijo v primerjavi z referenčnim materialom, za katerega je znana ustrezna aktivnost.

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

**POTREBNI MATERIALI IN PRIPOMOČKI, KI NISO PRILožENI**

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

## ODVZEM VZORCEV IN RAVNANJE Z NJIMI

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

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

## PRIPRAVA ZA UPORABO

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

## NAVODILA ZA UPORABO

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

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

### A. Priprava mikrokultur polne krvi

1. V epruveto s heparinom brez fenola odvzemite 5–20 ml sveže krvi in premešajte z obračanjem.
2. PHA rekonstituirajte tako, da mu s sterilno brizgo dodate 5 ml sterilne destilirane vode.
3. Z aseptično tehniko pripravite potreben volumen medija CHANG Medium MF (gojišča za mikrokulture), tj. po 5 ml za vsako od dveh centrifugirnih epruvet na vzorec krvi.
4. Medij CHANG Medium MF porazdelite v ustrezno označene sterilne centrifugirne epruvete z navojnimi zaporkami in aseptično dodajte 0,1 ml rekonstituiranega PHA.
5. Neposredno pred začetkom gojenja dodajte 0,4 ml heparinizirane krvi z uporabo 1 ml sterilne pipete. Za dojenčke in otroke uporabite 0,3 ml krvi, za nosečnice pa 0,5 ml.
6. Kulture inkubirajte 72 ur pri temperaturi 37 °C. Pri vzorcih dojenčkov in otrok 48 ur inkubirajte eno od dveh kultur pri temperaturi 37 °C. Pri vzorcih nosečnic lahko eno od dveh kultur inkubirate 96 ur pri 37 °C. Vsak dan premešajte vsako epruveto z obračanjem.
7. 16–18 ur pred dodajanjem timidina v vsako kulturo dodajte 0,05 ml (50 µl)/5 ml delovne raztopine metotreksata.
8. Po končani sinhronizaciji z metotreksatom vsaki kulturi dodajte 0,1 ml (100 µl)/5 ml delovne raztopine timidina (5–6 ur, preden jih spravite).

### B. Pobiranje kultur

1. Pred pobiranjem segrejte hipotonično raztopino (75 mM kalijevega klorida) v vodni kopeli s temperaturo 37 °C.
2. V vsako kulturo dodajte 0,5 µl raztopine kolcemida.
3. Nežno premešajte in vrnite v inkubator s temperaturo 37 °C.
4. Po 30 minutah vzemite kulture iz inkubatorja.
5. Kulture 10 minut centrifugirajte v namizni centrifugi pri 1000 vrt./min.
6. Odstranite večino supernatanta in ga zavrzite.
7. Usledilo ponovno suspendirajte v 6–8 ml 75 mM raztopine kalijevega klorida, predhodno segrete na 37 °C; to naj traja 10 minut.
8. Centrifugirajte kot v 5. koraku in zavrzite supernatant.
9. S Pasteurjevo pipeto v usledilo počasi dodajte 6–8 ml sveže pripravljene modificiranega fiksativa po Carnoyu (3 deli absolutnega metanola : 1 del ledocetne kisline) med neprekinjenim mešanjem v vrtinčnem mešalniku. Fiksativ dodajate najprej po kapljicah, nato pa v počasnem curku, da zmanjšate tveganje za poškodbe celic in nastanek grudic.
10. Pustite 10 minut pri sobni temperaturi.
11. Centrifugirajte kot v 5. koraku in odstranite supernatant kot prej, nato pa počasi dodajte še 5 ml fiksativa za ponovno suspendiranje usledine.
12. Še dvakrat ponovite 11. korak in ponovno suspendirajte v 0,5 ml fiksativa. To celično suspenzijo uporabite za pripravo preparatov za preiskavo. Pazite, da celic ne boste preveč pretresali.

### C. Priprava preparatov

1. Objektna stekelca morajo biti popolnoma čista. Ustrezen postopek čiščenja je, da stekelca čez noč namočite v kromovi kislini, nato pa jih vsaj pol ure čistite pod tekočo vodo, preden jih zložite s krpo za steklo.
2. Nanesite 1 ali 2 kapljici ponovno suspendiranega celičnega preparata na sredino objektnega stekelca (8–10 cm oz. 3–4 palce nad vrhom stekelca) in pustite, da se razširi po površini.
3. S filtrirnim papirjem obrišite odvečni fiksativ z robov stekelca.
4. Takoj ko se pojavijo Newtonovi obroči, z nežnim pihanjem pospešite dokončno osušitev preparata.
5. Preparat obarvajte z barvilom Giemsa in ga pritrdite.



## **KLINIČNE APLIKACIJE**

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

## **SHRANJEVANJE IN STABILNOST**

Medij CHANG Medium MF je treba shranjevati zamrznjen pri temperaturi pod  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dokler ni pripravljen za uporabo. Če se medij Chang Medium MF shranjuje zamrznjen, je stabilen do datuma izteka uporabnosti, ki je naveden na nalepki steklenice. Odtaljen izdelek, ki ga niste porabili, lahko razdelite na delovne alikvote in ponovno zamrznete (največ dvakrat) za poznejšo uporabo ali pa dobro zaprete s pokrovčkom in do 30 dni hranite pri temperaturi  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zaščitite pred fluorescenčno svetlobo.

## **PREVIDNOSTNI UKREPI IN OPOZORILA**

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

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

